

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL



**FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE HIDROXITIROSOLO DURANTE
LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

Memoria presentada por la graduada INMACULADA REBOLLO
ROMERO para optar al grado de doctora por la Universidad de Sevilla

Sevilla, junio de 2022

AREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954556761
Fax: 954233765




Dña. SILVIA PICHARDO SÁNCHEZ, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

INFORMA: Que la Tesis Doctoral titulada “FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIROSOLO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA”, presentada por la Gda. Dña. INMACULADA REBOLLO ROMERO para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Área de Nutrición y Bromatología de este Departamento bajo la dirección de la Dra. Ana Belén Cerezo López y la Dra. M^a Carmen García Parrilla, cumpliendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 17 de junio de 2022.

Fdo. Silvia Pichardo Sánchez

Código Seguro De Verificación	bY0nLrYWWhpCLsb88AwZh5A==	Fecha	17/06/2022
Firmado Por	SILVIA PICHARDO SANCHEZ	Página	1/1
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/bY0nLrYWWhpCLsb88AwZh5A==		



DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL
FACULTAD DE FARMACIA
C/ Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954556761
Fax: 954233765



M^a CARMEN GARCÍA PARRILLA, Catedrática de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla, y ANA BELÉN CERESO LÓPEZ, Profesora Titular del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla,


INFORMAN: Que la Tesis Doctoral titulada “FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIROSOLO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA”, ha sido realizada por la Gda. Dña. INMACULADA REBOLLO ROMERO en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firmamos en Sevilla, Junio de 2022

Fdo. M^a Carmen García Parrilla

Fdo. Ana Belén Cerezo López

Código Seguro De Verificación	R6gMh7i152b8ie6Kl0d41Q==	Fecha	17/06/2022
Firmado Por	ANA BELEN CERESO LOPEZ MARIA DEL CARMEN GARCIA PARRILLA		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/R6gMh7i152b8ie6Kl0d41Q==	Página	1/1



A mi abuelo Vicente

“La audacia de saber sin límite. Es uno de los caracteres más apasionantes de la investigación científica.”

Jean-Pierre Changeux

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con la financiación de los siguientes proyectos:

- Proyecto I+D+i FEDER Andalucía 2014-2020 “Estrategias para incrementar la producción de Hidroxitirosol por levaduras y su potencial aplicación en bebidas fermentadas” otorgado por la Junta de Andalucía (Consejería de Economía y Conocimiento) y la Universidad de Sevilla (Referencia: US-1263469) (Investigadoras principales: María del Carmen García Parrilla y Ana María Troncoso González)
- Proyecto PAIDI I+D+i “Empleo de levaduras productoras de hidroxitirosol y derivados como estrategia para la elaboración de vinos con valor añadido” otorgado por la Junta de Andalucía (Consejería de Economía y Conocimiento) (Referencia: P18-RT-3098) (Investigadoras principales: María del Carmen García Parrilla y Ana María Troncoso González)
- Proyecto del Plan Estatal 2017-2020 Retos - Proyectos I+D+i “Potencial Bioactivo de Metabolitos Sintetizados por Microorganismos Seleccionados y su Impacto en la Calidad y Seguridad de Bebidas Fermentadas” otorgado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Referencia: PID2019-108722RB-C32) (Investigadoras principales: María del Carmen García Parrilla y Ana María Troncoso González)

Además, esta Tesis ha podido realizarse gracias a las instalaciones del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) y de la Universidad Pablo de Olavide, de los Servicios Generales de la Universidad de Sevilla (CITIUS) y del Centro Rancho de la Merced (IFAPA).



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primero de todo me gustaría expresar mis agradecimientos a mis directoras de tesis M^a Carmen y Ana Belén. Gracias no solo por vuestra profesionalidad y vuestros consejos sino por haberme acogido desde el primer momento como una más del grupo, mostrándome vuestro cariño, apoyo y paciencia a lo largo de todos estos años.

Gracias también a Ana Troncoso por mostrarme su apoyo y estar siempre pendiente de mis avances en las investigaciones aportando su opinión y experiencia.

A Edu, tú fuiste mi guía cuando entré en el grupo de investigación. Gran parte de lo que he aprendido en estos años ha sido gracias a ti. Gracias por tu paciencia teniendo que supervisar a una persona, el tiempo vale oro y tú me has regalado mucho. Nunca olvidaré esos días en el laboratorio donde todo era más divertido por tenerte cerca, irradiando esa luz que desprendes y ese buen humor que te caracteriza.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio. A Marta, por empezar juntas esta etapa, estar siempre dispuesta a echarme una mano y recibirme siempre que coincidíamos en el laboratorio con esa sonrisa que tanto te representa. A Fernando y a Elena por haberme ayudado en varios momentos de la realización de esta tesis, especialmente en las fermentaciones y a Marina por tu ayuda y compañía en la UPO y en el CITIUS, siempre atenta a prestarme cualquier ayuda. A Rocío, Pilar, Ruth, Cristina, Lourdes y Raquel por aportar un muy buen ambiente de trabajo en el laboratorio y preocuparse siempre por cómo me iba con la realización de la tesis. A Félix, por estar siempre ahí para solucionar mis dudas y echarme una mano.

A la Dra. Emma Cantos Villar por su aportación de los diferentes vinos usados en los experimentos, al Dr. Fernando Govantes por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones, al Dr. Modesto y a la Dra. Laura Navarro por facilitarme el uso de sus equipos e instalaciones, así como por su asesoramiento en cuanto al uso de diferentes equipos y a las Dras. Rocío Valderrama y M^a Eugenia Soria por enseñarme acerca del análisis de muestras y la espectrometría de masas.

A la Dr. Josefa Álvarez por solventar mis dudas con gran profesionalidad y cercanía.

A mis amigos Blanca, Felipe, Javi Pérez, Alberto, Javi, Marina, Pilar, Inés y Laura por sus ánimos constantes y su positividad.

A mis primos Clara, Elo, Juan y Ángeles, mis tíos y mis suegros por interesarse por mis avances en la realización de la tesis y motivarme.

A Fernando, por aparecer en el momento oportuno. Por hacer que la vida sea más bonita. Por respetar mi tiempo disponible para estar juntos. Por aguantar mis malos momentos y sacarme siempre una sonrisa. Por ser mi lugar favorito en el mundo.

A mis hermanos Inés y Fernando, por haber soportado estos 5 años de doctorado, no solo los buenos momentos sino aquellos en los que he estado más susceptible. Gracias por vuestra paciencia y vuestro cariño diario.

A mis padres, por vuestro apoyo incondicional. Gracias por haber hecho de mí una persona constante, trabajadora y luchadora, que, al caerse varias veces, se levanta y sigue para delante. Como siempre dice mi madre: "lo importante es la constancia". Gracias por vuestro amor infinito.

A mis abuelos, por ser mis ejemplos de vida. A mi abuelo Fernando, por cuidarme desde arriba y a mi abuelo Vicente, por sus incansables ánimos por tener a otro doctor en la familia y por creer en mí más incluso que yo misma.

Todos habéis contribuido, en mayor o menor medida, al desarrollo de esta tesis, gracias de corazón.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abreviaturas	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Aminoácidos precursores de compuestos bioactivos producidos por microorganismos.....	10
1.2. Compuestos bioactivos derivados de aminoácidos.....	12
1.2.1. Triptofol.....	14
1.2.2. Ácido 3-indolacético.....	23
1.2.3. Melatonina	30
1.2.4. Serotonina	43
1.2.5. Glutación	46
1.2.6. GABA.....	50
1.2.7. Tiroso.....	56
1.2.8. Hidroxitiroso.....	66
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	74
2.1. Justificación.....	74
2.2. Objetivos	74
3. MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.1. Materiales.....	76
3.1.1. Patrones analíticos	76
3.1.2. Cepas de levaduras.....	76
3.1.3. Muestras.....	77
3.1.3.1. Mosto sintético.....	77

3.1.3.2. Mosto natural	78
3.1.4. Medio YPD	80
3.1.5. Otros reactivos.....	80
3.1.5.1. Inactivación celular (quenching)	80
3.1.5.2. Extracción de metabolitos intracelulares	80
3.1.5.3. Extracción en fase sólida (SPE)	80
3.1.5.4. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC/HRMS)	81
3.1.6. Instrumentación	81
3.1.6.1 Aparatos	81
3.1.6.2 Equipos de cromatografía.....	83
3.2. Métodos	83
3.2.1. Elaboración del mosto sintético (<i>Capítulos 1 y 2</i>).....	83
3.2.2. Elaboración del mosto natural (<i>Capítulos 3 y 4</i>).....	85
3.2.3. Preinoculación (<i>Capítulos 1-4</i>).....	85
3.2.4. Inoculación (<i>Capítulos 1-4</i>).....	86
3.2.5. Fermentación alcohólica (<i>Capítulos 1-4</i>)	86
3.2.5.1 Medición de CO ₂ desprendido	87
3.2.5.2. Medición de la densidad óptica.....	88
3.2.5.3. Mediciones de etanol, azúcares residuales y nitrógeno	88
3.2.6. Toma de muestras (<i>Capítulos 1-4</i>)	91
3.2.7. Tratamiento de las muestras (<i>Capítulos 1-4</i>).....	92
3.2.7.1. Inactivación celular (quenching)	92
3.2.7.2. Extracción de metabolitos intracelulares	93
3.2.7.3. Extracción en fase sólida.....	94
3.2.7.4. Desechado y resuspensión	95

3.2.8. UHPLC/HRMS (<i>Capítulos 1-4</i>).....	95
3.2.9. Análisis estadístico (<i>Capítulos 1-4</i>).....	97
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
Capítulo 1.....	99
Capítulo 2.....	104
Capítulo 3.....	113
Capítulo 4.....	119
5. CONCLUSIONES.....	129
6. BIBLIOGRAFÍA	131
7. ANEXO.....	165

RESUMEN

Los compuestos bioactivos son capaces de regular ciertas funciones metabólicas aportando beneficios para la salud. Es un grupo muy diverso y heterogéneo y entre ellos se encuentran la melatonina, serotonina, ácido 3-indolacético, triptofol, ácido γ -aminobutírico (GABA), glutatión (GSH), tirosol e hidroxitirosol (HT). Estos compuestos bioactivos, en concreto, pueden ser producidos por diferentes microorganismos durante el proceso de fermentación, a partir de diferentes aminoácidos: el L-triptófano, el L-glutamato, la L-cisteína y la glicina y la tirosina. Estos aminoácidos se encuentran en el mosto de uva (blanco y tinto) y de cerveza, y durante la fermentación alcohólica (FA), las levaduras, los metabolizan dando lugar a estos bioactivos en bebidas fermentadas como el vino y la cerveza. Estos compuestos bioactivos, derivados de aminoácidos, son de especial interés ya que poseen propiedades beneficiosas para la salud como actividad antioxidante, antimicrobiana, neuroprotectora, antidiabética y cardioprotectora, entre otras.

La presente Tesis Doctoral tiene por objetivo evaluar diferentes condiciones de fermentación que pueden llevar a un aumento de la producción de uno de estos compuestos, en concreto el HT, con el fin de obtener vinos más ricos en este bioactivo.

El capítulo 1 se centra en la producción de HT, en mosto sintético, por diferentes cepas de levaduras (*S. cerevisiae* Aroma White, *S. cerevisiae* ES 488, *S. cerevisiae* ICV GRE, *S. cerevisiae* QA23, *S. cerevisiae* Red Fruit, *S. cerevisiae* Uvaferm, *T. delbrueckii* Biodiva TD291, *M. pulcherrima* Flavia MP346, *S. cerevisiae* Yero 2.23 y *S. cerevisiae* Yero 2.24) para determinar si la cepa es un factor que influye en la producción de este compuesto y para seleccionar la más productora.

Una vez seleccionada la cepa que genera una mayor síntesis de este compuesto, el segundo capítulo se dirige a evaluar la producción de HT, en mosto sintético, por la cepa seleccionada, a partir de diferentes concentraciones iniciales de su aminoácido precursor, tirosina (10 mg/L y 60 mg/L). El objetivo es determinar si la concentración de tirosina inicial en el mosto influye en la producción de HT.

El tercer capítulo se dedica a la monitorización de la síntesis de HT durante la fermentación alcohólica, por la cepa seleccionada, en mostos de uva natural (Chardonnay y Palomino Fino), al objeto de verificar si el tipo de mosto (sintético vs natural) es un factor que determina la producción de este compuesto bioactivo.

El capítulo 4 tiene como objetivo el seguimiento durante la fermentación alcohólica de la producción de HT y tirosol, por la cepa seleccionada, en mostos de uva natural (Pedro

Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino), analizando si la esterilización del mosto y la temperatura de fermentación son dos factores que influyen en la producción de HT. Asimismo, se evaluó si la variedad de uva es un factor que influye en la síntesis de este compuesto.

Para la consecución de estos objetivos, primero se elaboraron los mostos, luego se llevaron a cabo la preinoculación y la inoculación con la levadura correspondiente, seguidamente tuvieron lugar las FA, después se tomaron muestras en diferentes momentos de las FA, a continuación, se trataron las muestras y, por último, se cuantificaron los compuestos en el UHPLC/HRMS. El tratamiento de las muestras intracelulares consistió en la inactivación celular (quenching), extracción de metabolitos intracelulares, extracción en fase sólida, desecado y la resuspensión. En el caso de las muestras extracelulares, se realizó la extracción en fase sólida, el desecado y la resuspensión.

Respecto a las diferentes cepas de levaduras analizadas, el HT fue producido por todas las cepas de levaduras, siendo las *S. cerevisiae* comerciales las que mayores concentraciones sintetizaron en comparación con las levaduras *S. cerevisiae* autóctonas y las no *S. cerevisiae*. Concretamente, la cepa de levadura *S. cerevisiae* Red Fruit fue la mayor productora de HT (6.12 ng/mL), generando este compuesto a lo largo de toda la FA, por lo que fue seleccionada para las siguientes fermentaciones.

La concentración inicial de tirosina en el mosto no mostró tener un efecto en la síntesis de HT ya que, aunque se incrementó seis veces la concentración del aminoácido precursor, las concentraciones de HT no aumentaron en la misma proporción. El HT se cuantificó tanto en el medio extra como intracelular siendo su concentración superior en el compartimento extracelular.

El tipo de mosto (sintético vs natural) pareció tener un efecto en la producción de HT ya que las concentraciones fueron 2.6–4.4 veces superiores en los mostos de uva naturales, comparados con los sintéticos.

Además, la variedad de uva también influyó en la producción de HT, siendo el mosto natural Chardonnay, seguido del Pedro Ximénez, en el que se obtuvieron mayores concentraciones de HT.

En cuanto a la temperatura de fermentación, no se mostró un claro efecto en todas las variedades de mosto fermentado. En las variedades Tempranillo y Palomino Fino las mayores concentraciones de HT tuvieron lugar con la temperatura de 25°C y en la variedad Pedro Ximénez con la temperatura de 18°C.

Por otro lado, las concentraciones más elevadas en dos de los mostos aparecieron en las condiciones de no esterilización en comparación con los esterilizados. Esto podría ser debido a la formación de HT por parte del resto de microorganismos presentes en los mostos naturales que podrían estar formando consorcios, contribuyendo así a aumentar la concentración de HT.

Estos resultados son de gran utilidad ya que aportan información crucial sobre las condiciones de fermentación que conducen a una mayor síntesis de HT (*S. cerevisiae* Red Fruit, mostos de las variedades Chardonnay y Pedro Ximénez, y no esterilización de los mostos) por las levaduras durante la fermentación alcohólica, al objeto de incrementar su producción y obtener vinos más ricos en este compuesto con propiedades bioactivas.

ABREVIATURAS

CABD: Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FA: Fermentación alcohólica

HESI: Ionización por electrospray calentada

HRMS: Espectrometría/espectrómetro de masas de alta resolución

HT: hidroxitirosol

IFAPA: Instituto de investigación y Formación Agraria y Pesquera

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

n.d: No detectable

n.q: No cuantificable

NCE: Energía de colisión normalizada

DO: Densidad óptica

OIV: Organización internacional del vino

PANOPA: Nitrógeno amino primario

PF: Palomino Fino

QS: Quorum-Sensing

R²: Coeficiente de regresión

RF: Cepa *S. cerevisiae* Red Fruit

rpm: Revoluciones por minuto

SPE: Extracción en fase sólida

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR-2: Receptor 2 de VEGF

YPD: Extracto de levadura con peptona y dextrosa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de Ehrlich de los aminoácidos aromáticos	13
Figura 2. Estructura química del triptofol.....	14
Figura 3. Estructura química del ácido 3-indolacético	24
Figura 4. Metabolismo de compuestos indólicos derivados del L-Triptófano.....	25
Figura 5. Estructura química de la melatonina	30
Figura 6. Rutas de síntesis de la melatonina en animales, plantas, levaduras y la ruta alternativa de síntesis	33
Figura 7. Estructura química de la serotonina.....	44
Figura 8. Estructura química del glutatión.....	47
Figura 9. Ruta de síntesis del glutatión y sus funciones fisiológicas generales en microorganismos	48
Figura 10. Estructura química del GABA.....	50
Figura 11. Reacción de formación del GABA	51
Figura 12. Captación y catabolismo de GABA en función del metabolismo del carbono central de la levadura.....	52
Figura 13. Estructura química del tirosol.....	56
Figura 14. Ruta de síntesis del tirosol en vinos por el metabolismo de la levadura	59
Figura 15. Estructura química del hidroxitirosol.....	66
Figura 16. Ruta de síntesis del hidroxitirosol en vinos por el metabolismo de la levadura.....	68
Figura 17. Mostos naturales Palomino Fino y Chardonnay durante la fermentación alcohólica.....	79
Figura 18. Mostos naturales Pedro Ximénez y Tempranillo durante la fermentación alcohólica	79
Figura 19. Elaboración del mosto sintético.....	84
Figura 20. Fermentación alcohólica de los mostos	87
Figura 21. Esquema del tratamiento de muestras.....	92
Figura 22. Muestras sometidas al proceso de extracción en fase sólida.....	94

Figura 23. Evolución de la liberación de CO ₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica.....	100
Figura 24. Producción de hidroxitirosol (ng/mL) en mosto sintético.....	101
Figura 25. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina	106
Figura 26. Evolución de la concentración de azúcares residuales (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina ...	106
Figura 27. Evolución de la concentración de etanol (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina.....	107
Figura 28. Evolución de la concentración de nitrógeno primario (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina	108
Figura 29. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina	109
Figura 30. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio intracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina	110
Figura 31. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en mostos sintético con diferentes contenidos de tirosina	112
Figura 32. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio intracelular, durante la fermentación alcohólica en mostos sintético con diferentes contenidos de tirosina	112
Figura 33. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay	114
Figura 34. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay	115
Figura 35. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay	118
Figura 36. Evolución de la liberación de CO ₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Pedro Ximénez.....	120

Figura 37. Evolución de la liberación de CO ₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Tempranillo	121
Figura 38. Evolución de la liberación de CO ₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Palomino Fino.	121
Figura 39. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Tempranillo durante la fermentación alcohólica.....	122
Figura 40. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Palomino Fino durante la fermentación alcohólica	123
Figura 41. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Pedro Ximénez durante la fermentación alcohólica	124
Figura 42. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Tempranillo durante la fermentación alcohólica	125
Figura 43. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Palomino Fino durante la fermentación alcohólica	126
Figura 44. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Pedro Ximénez durante la fermentación alcohólica	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aminoácidos precursores y sus compuestos bioactivos derivados.....	11
Tabla 2. Concentraciones de los aminoácidos precursores (tirosina, triptófano, glutamato, cisteína y glicina) de compuestos bioactivos en mostos de uva y cerveza... ..	11
Tabla 3. Condiciones fermentativas para la producción de triptofol.....	16
Tabla 4. Condiciones fermentativas para la producción de ácido 3-indolacético	26
Tabla 5. Condiciones fermentativas para la producción de melatonina.....	35
Tabla 6. Condiciones fermentativas para la producción de serotonina.....	44
Tabla 7. Condiciones fermentativas para la producción de glutatión.....	48
Tabla 8. Condiciones fermentativas para la producción de GABA	53
Tabla 9. Concentraciones de tirosol en vinos tintos y blancos	57
Tabla 10. Condiciones fermentativas para la producción de tirosol.....	60
Tabla 11. Concentraciones de hidroxitirosol en vinos tintos y blancos	67
Tabla 12. Condiciones fermentativas para la producción de hidroxitirosol	69
Tabla 13. Cepas de levaduras empleadas en el Capítulo 1	76
Tabla 14. Reactivos empleados en la elaboración del mosto sintético (MS300)	77
Tabla 15. Modificaciones en el contenido de sulfato de amonio y tirosina del mosto sintético (MS300) utilizado en el Capítulo 2	78
Tabla 16. Composición del medio de crecimiento para las levaduras	80
Tabla 17. Medición de CO ₂ de los mostos de las diferentes experiencias.....	88
Tabla 18. Medida de etanol.....	89
Tabla 19. Medida de los azúcares residuales	90
Tabla 20. Medida del nitrógeno primario.....	91
Tabla 21. Toma de muestras de las diferentes experiencias.....	91
Tabla 22. Ion protonado, energía de colisión y tiempo de retención de los compuestos estudiados.	96
Tabla 23. Gradiente de elución I	96

Tabla 24. Gradiente de elución II	96
Tabla 25. Gradiente de elución III	97
Tabla 26. Concentraciones de hidroxitirosol en mostos naturales Chardonnay y Palomino Fino.....	116
Tabla 27. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Tempranillo	122
Tabla 28. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Palomino Fino	123
Tabla 29. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Pedro Ximénez.....	124

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos bioactivos se definen como aquellos compuestos fitoquímicos presentes en los alimentos, que son capaces de regular las funciones metabólicas provocando un efecto beneficioso para el organismo humano (Galanakis, 2017). Muchos de ellos son metabolitos secundarios de las plantas, como los compuestos fenólicos (taninos, estilbenos, flavonoides, ácidos fenólicos, etc.), los alcaloides, los carotenoides, los terpenos, etc. (Giardi et al., 2010); (Jamwal et al., 2018); (Isah, 2019). Sin embargo, otros bioactivos son producidos por microorganismos como las levaduras, bacterias y hongos durante procesos como la fermentación. Entre estos compuestos destacan la melatonina, serotonina, ácido 3-indolacético, triptofol, GABA, glutatión, tirosol e hidroxitirosol (HT) (Hornedo-Ortega et al., 2016); (Fernández-Cruz et al., 2016); (Fernández-Cruz et al., 2020); (Guerrini et al., 2018); (Gori et al., 2011); (Tufariello et al., 2019); (Santos-Espinosa et al., 2020).

1.1 AMINOÁCIDOS PRECURSORES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS

Estos compuestos bioactivos son producidos por microorganismos durante la fermentación a partir de diferentes aminoácidos a través de la ruta de Ehrlich. El L-triptófano es el precursor de la melatonina y de la serotonina (Fernández-Cruz et al., 2017) así como de sus principales metabolitos: el triptofol, el alcohol superior más sintetizado (Kradolfer et al., 1982) y el ácido 3-indolacético, como el ácido superior más presente (Mas et al., 2014). El L-glutamato, la L-cisteína y la glicina (Li et al., 2004) son los precursores del glutatión y el L-glutamato del GABA (Bown & Shelp, 1997). La tirosina es el aminoácido del que derivan el tirosol e HT (Bordiga et al., 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. Aminoácidos precursores y sus compuestos bioactivos derivados

Aminoácido precursor	Compuesto bioactivo	Nombre sistemático
Triptófano	Melatonina	N-acetil-5-metoxitriptamina
	Serotonina	N-acetil-5-hidroxitriptamina
	Ácido 3-indolacético	ácido indol-3-acético
Tirosina	Triptofol	indol 3-etanol
	Tirosol	4-(2-hidroxietil)fenol
Glutamato	HT	3,4-dihidroxifeniletanol
	GABA	ácido 4-aminobutanoico
Cisteína	Glutati6n	Ácido (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-1-[(carboximetil)carbamoil]-2-sulfaniletil]carbamoil]butanoico
Glicina		

Las concentraciones de los aminoácidos precursores (tirosina, triptófano, glutamato, cisteína y glicina) varían dependiendo del tipo de mosto (Tabla 2). En la Tabla 2 se muestra que las concentraciones más elevadas, de todos los aminoácidos, se encuentran en el mosto de cerveza, seguidas de los mostos de vino blanco y por último los mostos tintos, con excepción del aminoácido glicina cuya concentración en los mostos tintos es superior a la de los blancos.

Tabla 2. Concentraciones de los aminoácidos precursores (tirosina, triptófano, glutamato, cisteína y glicina) de compuestos bioactivos en mostos de uva y cerveza

Variedad	Tirosina (mg/L)	Triptófano (mg/L)	Glutamato (mg/L)	Cisteína (mg/L)	Glicina (mg/L)	Tipo de Uva	Referencia
Mosto de cerveza	161.95 ± 2.69	96.99 ± 2.85	152.68 ± 3.62	-	-	-	Lei et al., 2013
	-	10658	-	-	-	-	Fernández-Cruz et al., 2020
Cabernet Sauvignon	10.47 ± 0.38	7.26 ± 0.13	43.00 ± 0.18	1.51 ± 0.10	173.75 ± 3.82	Tinta	Wang et al., 2014
	10.21 ± 0.28	5.99 ± 0.15	38.91 ± 0.85	2.05 ± 0.03	143.83 ± 2.40		
Syrah	0.62 ± 0.03	-	-	-	-		
Merlot	n.d.	-	-	-	-		
Tempranillo	0.46 ± 0.02	-	-	-	-	Tinta	Rodríguez-Naranjo et al., 2013
Tintilla de Rota	0.34 ± 0.05	-	-	-	-		
Palomino Fino	n.d.	-	-	-	-	Blanca	
Tempranillo	-	≈ 3.5	-	-	-	Tinta	Fernández-Cruz et al., 2018
Corredera	-	≈ 0.4	-	-	-		
Sauvignon Blanc	-	≈ 1	-	-	-	Blanca	
Vijiriega	-	≈ 0.8	-	-	-		
Sauvignon Blanc	6.0	50.1	79.1	7.6	4.5	Blanca	Burin et al., 2015
Vermentino	5.6	32.0	118.1	2.9	5.9		
Viogner	11.2	78.2	88.4	8.5	7.2		

Estos aminoácidos precursores disminuyen durante la FA (Crepin et al., 2012); (Mas et al., 2014b); (Wang et al., 2014); (Hernández-Orte, et al., 2002) para la formación de sus compuestos bioactivos correspondientes (Mas et al., 2014b), llegando incluso a consumirse al final de la fermentación (Lei et al., 2013). Concretamente, Hernández-Orte et al., (2002) observaron que, en vinos blancos de la variedad Airen, el nivel de aminoácidos disminuyó durante la fermentación alrededor de un 60%, con excepción de la tirosina que disminuyó aproximadamente un 80%, la cisteína que fue totalmente consumida y la glicina que aumentó al ser excretada por las levaduras al final de la FA. Por otro lado, en el estudio de Lei et al., (2013), al final de la FA de cerveza, la levadura consumió un 79% de glutamato, un 30% de tirosina y un 31% de triptófano.

1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

Las levaduras llevan a cabo la FA obteniéndose bebidas fermentadas como el vino y la cerveza, así como otros productos como el pan (Maicas, 2020). Para que las levaduras puedan realizar la FA, necesitan nitrógeno asimilable (YAN) (Jiranek et al., 1995), siendo las dos principales fuentes de YAN el amonio y los aminoácidos (Beltran et al., 2004). El YAN está compuesto de nitrógeno procedente del amonio y principalmente de los alfa-aminoácidos (aminoácidos libres excepto la prolina). Las levaduras del vino son capaces de metabolizar más de 20 sustancias como fuentes únicas de nitrógeno para su crecimiento. No obstante, las levaduras prefieren algunas fuentes de nitrógeno sobre otras bajo condiciones de FA (Tesnière et al., 2015). El amonio es la fuente preferida de las levaduras frente a los aminoácidos y entre los aminoácidos, el glutamato y la asparragina se consideran fuentes de nitrógeno buenas o preferidas (Tesnière et al., 2015). Sin embargo, los aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina resultan de gran importancia debido a que, a partir de ellos se generan ciertos compuestos bioactivos.

Estos compuestos con propiedades bioactivas (triptofol, ácido 3-indolacético, melatonina, serotonina, GABA, glutatión, tirosol e HT) son sintetizados por las levaduras, durante la FA, a través de varias rutas.

Los alcoholes superiores son formados durante la fermentación, a partir de los ceto ácidos. Estos ceto ácidos son producidos a través de una de las dos rutas siguientes:

- La ruta catabólica, que implica la degradación de los amino ácidos presentes en la fermentación a través de la ruta de Ehrlich (Hazelwood et al., 2008).

- La ruta anabólica de biosíntesis de los aminoácidos a partir de la fuente de carbono (azúcares) (Hammond, 1993).

En levaduras *S. cerevisiae*, la principal ruta es la de Ehrlich de los aminoácidos aromáticos (Hazelwood et al., 2008) (Figura 1).

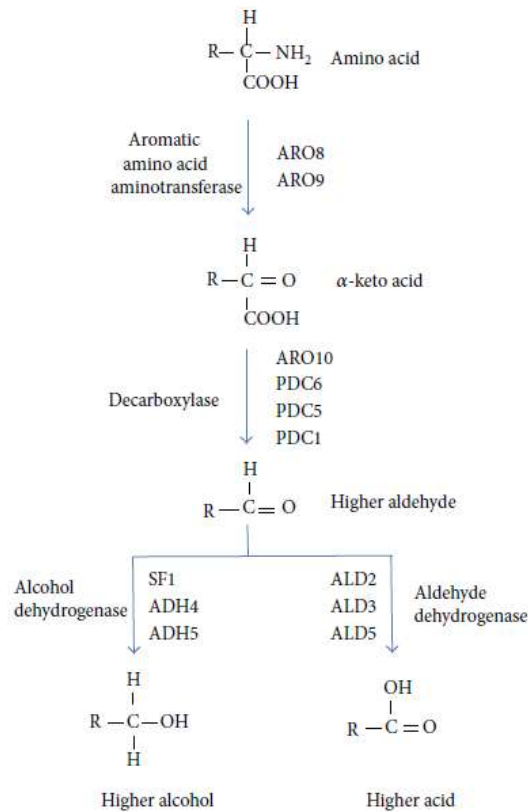


Figura 1. Ruta de Ehrlich de los aminoácidos aromáticos (Mas et al., 2014)

Estos compuestos bioactivos, derivados de aminoácidos, son de especial interés ya que poseen propiedades beneficiosas para la salud como actividad antioxidante (Kim et al., 2017); (Bonfont-Rousselot & Collin, 2010); (Mecoloni et al., 2012); (Pastore et al., 2003); (Fernández-Mar et al., 2012); (Fki, et al., 2005), antimicrobiana (Gañan et al., 2009), (Cueva et al., 2012); (Bisignano et al., 2010), neuroprotectora (St-Laurent-Thibault et al., 2011) y cardioprotectora (Samson Mathews et al., 2008), entre otras. Es por ello, que resulta de gran utilidad la investigación de estrategias que permitan incrementar la síntesis de estos compuestos en bebidas fermentadas como el vino.

En la bibliografía no se recogen estudios que se hayan centrado en la modulación de los parámetros de fermentación que conducen a una mayor síntesis de estos compuestos bioactivos. Sin embargo, algunos ensayos indican las condiciones de

fermentación y la consecuente concentración de estos compuestos en el producto final (Guerrini et al., 2018); (Romboli et al., 2015); (Wang et al., 2014); (Fernández-Cruz et al., 2016). A continuación, se detallan las condiciones fermentativas para la síntesis de estos compuestos bioactivos descritas en la bibliografía.

1.2.1. TRIPTOFOL

El triptofol es un alcohol superior (Mas et al., 2014a) que regula la morfogénesis durante la falta de nitrógeno y actúa como molécula Quorum-Sensing (QS) (Avbelj et al., 2016); (Wuster & Babu, 2009) que estimula el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006). Concretamente, al ser una molécula QS bajo condiciones bajas de nitrógeno (Hazelwood et al., 2008); (Wuster & Babu, 2009) promueve el cambio de las células a la fase estacionaria y regula la inducción de la formación de pseudohifas y el crecimiento invasivo, según la densidad celular local (Wuster & Babu, 2009); (Sprague & Winans, 2006); (Chen & Fink, 2006); (Hogan, 2006); (Leeder et al., 2011).

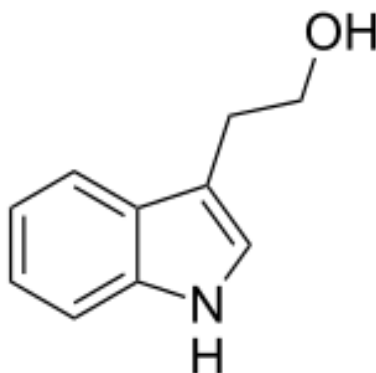


Figura 2. Estructura química del triptofol

Asimismo, este compuesto podría influir en las propiedades de la sensación en boca de las bebidas fermentadas ya que ha sido asociado con el sabor amargo en vino y cerveza (Gawel et al., 2018); (Szlavko et al., 1973).

Igualmente, se ha demostrado que el triptofol induce sueño en ratones (Cornford et al., 1981), aunque esta acción podría ser debido al análogo funcional o precursor de la serotonina o de la melatonina (Mas et al., 2014).

El triptofol es el principal alcohol superior a partir del triptófano y sus concentraciones elevadas en vino son bastante conocidas, las cuales se encuentran aproximadamente

entre los 4880 ng/mL y los 9150 ng/mL (Monagas et al., 2007). También se ha cuantificado su presencia en otros alimentos y bebidas fermentadas como la cerveza (242 ± 200 ng/mL) (Bartolomé et al., 2000) y el pan integral (Jiang & Peterson, 2013). Las concentraciones de triptofol en estos alimentos fermentados varían dependiendo de las condiciones de fermentación de los diferentes estudios. Estas condiciones de fermentación se discuten más adelante.

1.2.1.1. Ruta de síntesis

Las levaduras siguen la ruta de Ehrlich cuando su fuente de nitrógeno preferida, el amonio, está restringida y usan otras fuentes como los aminoácidos (Mas et al., 2014).

En el caso del triptofol, es sintetizado, a partir de su aminoácido precursor, el triptófano, por las levaduras durante la FA a través de la ruta de Ehrlich (Hazelwood et al., 2008) siendo uno de los principales metabolitos, y el alcohol superior más sintetizado de esta ruta (Kradolfer et al., 1982).

La ruta de síntesis del triptofol consiste en las siguientes reacciones:

1. Transaminación del triptófano: transaminación del grupo amino y la formación, a partir del triptófano, del α -ceto ácido correspondiente, el indol-3-piruvato (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b). Esta reacción es catalizada por la aminotransferasa aromática II la cual es codificada por el gen ARO9 (Chrzanowski, 2020).
2. Descarboxilación del indol-3-piruvato: este ceto ácido es descarboxilado, por la piruvato descarboxilasa, a su correspondiente aldehído, el indol 3-acetaldehído (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b). Esta reacción es catalizada por la descarboxilasa aromática codificada por el gen ARO10 y por la piruvato descarboxilasa (Avbelj et al., 2015).
3. Reducción del acetaldehído-3-indol: dependiendo del estado de oxidación-reducción de la célula, este aldehído puede ser metabolizado, por la alcohol deshidrogenasa, al alcohol aromático correspondiente, el indol 3-etanol (triptofol) o ser oxidado a su correspondientes ácido, el ácido indolacético (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014).

1.2.1.2. Condiciones fermentativas para la producción de triptofol

Tabla 3. Condiciones fermentativas para la producción de triptofol

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de triptofol	Referencia	
			Fructosa	Glucosa				
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> QA23	28	100 g/L	100 g/L	48 h de 2 días	≈ 177320 ng/mL	González et al., 2018	
	<i>S. bacillaris</i>					≈ 6448 ng/mL		
	<i>S. cerevisiae</i> QA23		100 g/L	100 g/L	6 de 7 días	≈ 30000 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2017	
	<i>T. delbrueckii Tdp</i>					≈ 16500 ng/mL		
	<i>S. cerevisiae</i> BM45		200 g/L	Final	Final	5460 ± 280 ng/mL	Guerrini et al., 2018	
	<i>S. cerevisiae</i> Premium Zinfandel					1730 ± 330 ng/mL		
	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White					-		100 g/L
			0 de 7 días	174.97 ± 0.74 ng/mL				
	<i>S. cerevisiae</i> EC1118		22	100 g/L	100 g/L	29 h de 29 h	≈ 28210 ng/mL	Zupan et al., 2013
	<i>T. pretoriensis</i>					12 primeras h de 28 h	≈ 0 ng/mL	
Vino Tannat	<i>S. cerevisiae</i> Natuferm 804	23-26	240 g/L		Maceración fría prefermentativa	1450 ± 80 ng/mL	Favre et al., 2014	
					Maceración tradicional	640 ± 60 ng/mL		
Vino Monastrell suplementado en Hys, Tyr y Trp	<i>S. cerevisiae</i> U.C.L.M. S325	22	-		Final (30 días)	≈ 12500 ng/mL	Bordiga et al., 2016	
Vino Monastrell suplementado en Hys						≈ 2000 ng/mL		
Vino Tempranillo	<i>S. cerevisiae</i> Red Fruit	16-18	-		6 de 14 días	≈ 2000 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2018	
Vino Vijiriega	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White	18			5-6 de 14 días	≈ 1200 ng/mL		
Mosto de uva de Muller Thurgau fermentado (cosecha tardía)	<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm CM	24	180 g/L		Después de la adición de sulfuroso (fermentación finalizada)	≈ 3000 ng/mL	Simat et al., 2004	
Mosto de uva de Muller Thurgau fermentado (cosecha temprana)		14				170 g/L		Final

Mosto sintético Fermentado	<i>S. cerevisiae</i> QA23	28	100 g/L	100 g/L	48 h de 2 días	≈ 403000 ng/mL (intracelular)	González et al., 2018
	<i>S. bacillaris</i>					≈ 16120 ng/mL (intracelular)	
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> P24	28	100 g/L	100 g/L	Inicio fase exponencial	8303.80 ± 527.15 ng/10 ⁸ células (intracelular)	Fernández-Cruz et al., 2019
	<i>H. uvarum</i> Hu4					133.02 ± 48.38 ng/10 ⁸ células (intracelular)	

El mosto sintético estándar suplementado 5 veces en aminoácidos aromáticos (50 µg/mL de tiramina, triptófano y fenilalanina) resultó en una mayor concentración de triptofol cuando se comparó con un mosto estándar, un mosto limitado en nitrógeno (300 mg/L) y un mosto bajo en glucosa (20 g/L de glucosa y 0 g/L de fructosa) (González et al., 2018). Los resultados de González et al., (2018) demuestran que un aumento de triptófano (0.058-0.871 g/L), en el mosto sintético, conduce a una mayor producción de su alcohol resultante, el triptofol (0 - 403000 ng/mL aprox). Otros estudios también observaron que el incremento de triptófano (50 mg/mL y 50 µg/mL) dio lugar a un aumento general en la producción de triptofol (<1500-≈ 14000 µg/g peso seco y ≈ 1700 µg/g peso seco) (Gori et al., 2011); (Ghosh et al., 2008). Sin embargo, estos autores observaron que estos incrementos en los alcoholes no eran proporcionales a los aumentos en los precursores (Ghosh et al., 2008); (Gori et al., 2011).

En el estudio de Bordiga et al., (2016), el mosto de uva Monastrell suplementado con histidina, tirosina y triptófano (50 mg/L, 25 mg/L y 10 mg/L) dio lugar a la mayor concentración de triptofol (≈ 12500 ng/mL) en comparación con el mosto suplementado sólo con histidina y el mosto no suplementado (Tabla 3). El mosto suplementado solo con histidina (50 mg/L) fue el que resultó en una menor concentración de triptofol (≈ 2000 ng/mL).

A su vez, la producción de alcoholes aromáticos está autoestimulada por el triptofol. Esto es debido a que el triptofol induce las enzimas requeridas para su propia síntesis, proporcionando un bucle de retroalimentación positiva. Por consiguiente, una alta densidad poblacional de células producen más alcoholes aromáticos por célula que una baja densidad poblacional (Wuster & Babu, 2009); (Chen & Fink, 2006).

El triptofol fue sintetizado por la mayoría de las cepas de levaduras analizadas en varios estudios: *S. cerevisiae* QA23 (≈ 177320 ng/mL), *T. delbrueckii* Tdp (≈ 128960 ng/mL), *H. uvarum* Hu4 (≈ 64480 ng/mL), *M. pulcherrima* Mpp (≈ 59644 ng/mL), *S. bacillaris* Cz4

(\approx 6448 ng/mL) (González et al., 2018); *S. cerevisiae* QA23 (\approx 30000 ng/mL) , *S. cerevisiae* RF (\approx 30000 ng/mL), *S. cerevisiae* ES488 (\approx 28000 ng/mL), *S. cerevisiae* Uvaferm BC (\approx 28000 ng/ml), *S. cerevisiae* ICV GRE (\approx 25000 ng/mL), *M. pulcherrima* MP346 (\approx 25000 ng/mL), *T. delbrueckii* Tdp (\approx 16500 ng/mL) (Fernández-Cruz et al., 2017); *S. cerevisiae* BM45 (5460 ± 280 ng/mL), *S. cerevisiae* R6 (4700 ± 830 ng/mL), *S. cerevisiae* P8 (3470 ± 1220 ng/mL), *S. cerevisiae* Zymaflore VL1 (2720 ± 300 ng/mL), *S. cerevisiae* EC1118 (2110 ± 180 ng/mL), *S. cerevisiae* Premium Zinfandel (1730 ± 330 ng/mL) (Guerrini et al., 2018) y *S. cerevisiae* EC1118 (\approx 28210 ng/mL), ZIM 850 *Z. bailii* (\approx 15797.6 ng/mL), ZIM 670 *H. uvarum* (\approx 8866 ng/mL), ZIM 734 *T. pretoriensis* (\approx 0 ng/mL) (Zupan et al., 2013).

Por contra, Zupan et al., (2013) encontraron que, en mosto sintético, las levaduras vínicas ZIM 842 *Candida zemplinina* y ZIM 701 *Dekkera bruxellensis* no produjeron triptofol.

Gerrini et al., (2018) manifiestan que la cantidad final de triptofol encontrada en los vinos mostraron una correlación positiva ($R^2 = 0.97$, $p < 0.05$), indicando un comportamiento cepa-dependiente en la producción de este alcohol superior. En concreto, las cepas que más triptofol produjeron fueron la *S. cerevisiae* BM45 (5460 ± 280 ng/mL), *S. cerevisiae* R6 (4700 ± 830 ng/mL) y *S. cerevisiae* P8 (3470 ± 1220 ng/mL) y las que menos *S. cerevisiae* Zymaflore VL1 (2720 ± 300 ng/mL), *S. cerevisiae* EC1118 (2110 ± 180 ng/mL) y *S. cerevisiae* Premium Zinfandel (1730 ± 330 ng/mL) (Guerrini et al., 2018). De acuerdo con González et al., (2018), las levaduras no- *Saccharomyces* con frecuencia forman bajos niveles de alcoholes superiores en comparación con las *S. cerevisiae*. No obstante, hay una gran variabilidad entre las cepas (Romano et al., 1992); (Zironi et al., 1993).

González et al., (2018) sostienen que la mayor síntesis de estos alcoholes en *S. cerevisiae* puede ocurrir porque las especies no *S. cerevisiae* (*C. stellata*, *C. zemplinina* y *S. bombicola*) difieren de las *S. cerevisiae* en la distribución del flujo metabólico durante la fermentación y, por consiguiente, en la producción de etanol, en la síntesis de biomasa y en la formación de subproductos (Ciani et al., 2000); (Magyar & Tóth, 2011); (Milanovic et al., 2012); (Tofalo et al., 2012).

Favre et al., (2014) declaran que la actividad de las cepas de levaduras nativas en la fase prefermentativa fue posiblemente la responsable de que las concentraciones obtenidas de triptofol fueran significativamente superiores antes de llevarse a cabo la FA, en la maceración fría prefermentativa (antes de la maceración tradicional) (1450 ± 80 ng/mL) en comparación con la maceración tradicional (simultánea a la FA).

Fernández-Cruz et al., (2016) demostraron que en mosto sintético fermentado con la cepa *S. cerevisiae* Aroma White, la concentración de triptofol aumentó desde el inicio de la fermentación hasta alcanzar su máxima concentración (19277.6 ± 40.95 ng/mL) a mitad de fermentación (día 4 de 7 días), después disminuyeron hasta el día 6 y finalmente aumentaron en el último día de fermentación (Fernández-Cruz et al., 2016). Sin embargo, en otros estudios en mosto sintético, el triptofol aumentó progresivamente a lo largo de toda la fermentación hasta alcanzar su máxima concentración (≈ 32240 ng/mL y ≈ 177320 ng/mL) al final de la fermentación (29 h y 48 h) (Zupan et al., 2013); (González et al; 2018).

Por otro lado, Fernández-Cruz et al., (2017) observaron que la concentración de triptofol, en mosto sintético, con la levadura *S. cerevisiae* QA23, aumentó bruscamente del día 1 al 2 de fermentación, después disminuyeron las concentraciones hasta el día 4 y a partir de ahí volvieron a aumentar hasta alcanzar también la máxima concentración al final de la fermentación (día 6 de 7 días) finalizando el proceso con una concentración inferior. La concentración máxima fue de aproximadamente 30000 ng/mL. Sin embargo, la menor concentración tuvo lugar a mitad de la fermentación (día 3 de 7 días) y fue de aproximadamente 17500 ng/mL. Según Fernández-Cruz et al., (2017) después de que el compuesto aumentara del día 1 al día 2, permaneció casi inalterado en el medio, lo cual puede sugerir que las levaduras no necesitaron triptofol del todo para su metabolismo.

Algo similar ocurre en el mosto de uva natural, en el caso del mosto de uva Tempranillo, con la levadura *S. cerevisiae* RF la concentración de triptofol aumentó durante la FA hasta el día 4, luego disminuyó levemente y después volvió a aumentar hasta alcanzar su máxima concentración (≈ 2000 ng/mL) a mitad de la fermentación (día 6 de 14). Finalmente disminuyó progresivamente. Sin embargo, con la fermentación espontánea se obtuvo una concentración superior, la cual fue de 2668 ng/mL (Fernández-Cruz et al., 2018). La menor concentración (≈ 1200 ng/mL) se observó también a mitad de la fermentación (5-6 de 14 días) (Fernández-Cruz et al., 2018).

En vinos Tannat, la menor concentración (0.64 ± 0.06 mg/L), con la levadura *S. cerevisiae* Natuferm 804, apareció en la maceración tradicional (simultánea a la FA). Por otro lado, la mayor concentración (1.45 ± 0.08 mg/L) se encontró antes de llevarse a cabo la FA, específicamente, en una maceración fría prefermentativa (antes de la maceración tradicional) en comparación con la maceración tradicional, la vinificación con adición de enzimas pectolíticas en el “barreling” y la adición de taninos de las semillas de las uvas en el “barreling” (Favre et al., 2014). Feuillat (1997) demostraron

un aumento en la diversidad de levaduras en los primeros pasos de la maceración fría prefermentativa. Debido a que la presencia de triptofol en vinos deriva del metabolismo del triptófano por parte de las levaduras (Monagas et al., 2005), este aumento en la diversidad de levaduras, demostrado por Feuillat (1997), podría explicar la aparición de la concentración más elevada en la maceración fría prefermentativa.

Contrariamente a lo observado por Favre et al., (2014), Simat et al., (2004) examinaron que la concentración máxima de triptofol, en zumos de uvas, apareció después de la adición de sulfuroso (120 mg/l de bisulfato de potasio) que se lleva a cabo tras la fermentación. Esta máxima concentración, que fue de 3 mg/L, fue superior que aquellas encontradas en las etapas de inicio de la fermentación, fermentación turbulenta, mitad y final de la fermentación.

Fernández-Cruz et al., (2019) observaron que, en mosto sintético, todas las cepas de levaduras analizadas produjeron triptofol en el medio intracelular. La mayor concentración tuvo lugar con la levadura *S. cerevisiae* P24 (8303.80 ± 527.15 ng/10⁸ células) en comparación con las levaduras *S. cerevisiae* QA23 (8204.25 ± 982.44 ng/10⁸ células), *T. delbrueckii* Tdp CECT13135 (842.79 ± 143.23 ng/10⁸ células) y *H. uvarum* Hu4 CECT13130 (133.02 ± 48.38 ng/10⁸ células). Respecto a la tendencia en la producción de triptofol en el medio intracelular, la mayor concentración tuvo lugar al inicio de la fase exponencial (8303.80 ± 527.15 ng/10⁸ células), con la levadura *S. cerevisiae* P24, y a partir de este momento la concentración disminuyó hasta finalizada la fermentación. La concentración más baja (133.02 ± 48.38 ng/10⁸ células) también apareció al inicio de la fase exponencial, con la levadura *H. uvarum* Hu4 (Fernández-Cruz et al., 2019). Por el contrario, en el estudio de González et al., (2018) la concentración de este compuesto aumentó progresivamente, en el mosto sintético, hasta alcanzar su máxima concentración (≈ 403000 ng/mL) al final de la fermentación (48 h de 2 días), con la levadura *S. cerevisiae* QA23. La menor concentración (≈ 16120 ng/mL) se obtuvo también al final de la fermentación (48 h de 2 días), con la levadura *S. bacillaris* (González et al., 2018).

Un factor que influyó en la producción de triptofol fue la variedad de uva. Concretamente, el vino tinto Tempranillo (temperatura de fermentación de 16-18°C) resultó en una mayor concentración de triptofol (≈ 2000 ng/mL) en comparación con los vinos blancos Corredera, Chardonnay, Moscatel, Palomino Fino, Sauvignon Blanc y Vijiriega (≈ 1200 ng/mL) (temperatura de fermentación de 18°C). La mayor concentración tuvo lugar, en el vino Tempranillo, con la fermentación espontánea seguida de la fermentación con la cepa *S. cerevisiae* RF en comparación con las levaduras *S. cerevisiae* Aroma White y

S. cerevisiae QA23, la inoculación secuencial con *T. delbrueckii* y QA23 y la inoculación secuencial con *T. delbrueckii* y RF. Por otro lado, la concentración más baja de este compuesto con la cepa *S. cerevisiae* Aroma White apareció en el mosto de uva Vijiriega (Fernández-Cruz et al., 2018). Sin embargo, la concentración inicial de triptofol en este mosto de Tempranillo fue baja (4.9 ng/mL), comparado con el nivel (123 ng/mL) determinado para el mosto de uva Monastrell (Bordiga et al., 2016).

Otros factores que han demostrado influir en la producción de triptofol son el pH (Ghosh et al., 2008); (Gori et al., 2011), la agitación (Zupán et al., 2013), la densidad celular de los cultivos (Gori et al., 2011); (González et al., 2018), la temperatura de fermentación (Bordiga et al., 2016); (Simat et al., 2004), la concentración de glucosa de los mostos (González et al., 2018), si la cosecha es temprana o tardía (Simat et al., 2004) , si son zumos o purés elaborados a partir de las uvas (Simat et al., 2004) y la suplementación con nutrientes (Simat et al., 2004).

Gori et al., (2011) manifiestan que la producción de triptofol (161.2-322.4 ng/mL) fue ante todo determinada desde el final de la fase exponencial indicando una conexión con la densidad celular. Además, declaran que cultivos con una alta densidad celular parecieron producir unas concentraciones superiores de alcoholes moléculas QS en comparación con cultivos con una baja densidad celular. Opinan que eso sugiere que el alcohol aromático, triptofol, es una potencial molécula QS en la levadura *Debaryomyces hansenii* como se encontró previamente para *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006).

Bordiga et al., (2016) mantienen que el factor temperatura afectó a todos los pasos del muestreo de manera significativa. Específicamente, el mosto que resultó en la mayor (\approx 12500 ng/mL) concentración de triptofol fue fermentado a 22°C en comparación con la temperatura de fermentación de 16°C (\approx 8000 ng/mL). Por otro lado, Simat et al., (2004) mostraron que las mayores concentraciones de triptofol (\approx 3000 ng/mL) tuvieron lugar en la mayoría de las fermentaciones de uvas Muller Thurgau, cosechadas tardíamente, a las temperaturas más elevadas (22-24°C) en comparación con las temperaturas de 12-14°C (\approx 1000 ng/mL).

El grado de alcohol no pareció influir en la producción de triptofol ya que, tanto el vino que dio lugar a la mayor concentración de triptofol como el que dio lugar a la menor concentración poseían 15° de alcohol en comparación con la graduación alcohólica de 12° (Bordiga et al., 2016).

De acorde con González et al., (2018) la limitación en glucosa generalmente inhibe la producción de alcoholes aromáticos por lo que elaboraron un mosto sintético bajo en

glucosa para evaluar el efecto en la producción de triptofol. Específicamente, después de 5 días de fermentación, las concentraciones de triptofol fueron desde cercana a 0 ng/mL en el mosto bajo en glucosa (20 g/L de glucosa y 0 g/L de fructosa) a aproximadamente 35464 ng/mL con la levadura *M. pulcherrima* Mpp en el mosto bajo en glucosa suplementado 5 veces en aminoácidos aromáticos (50 µg/mL de tirosina, triptófano y fenilalanina) (González, et al., 2018). Estos autores justifican esta baja producción de triptofol en el mosto bajo en glucosa con varias explicaciones:

1. La primera es que esta baja producción puede estar relacionada con la baja densidad celular (el valor de DO 600nm en el mosto bajo en glucosa fue de 4.80 ± 0.37 vs. 11.47 ± 1.32 en el mosto estándar). Además, mantienen que las células a una baja densidad requieren de menor síntesis de proteínas, lo cual puede explicar porque las células consumen menos aminoácidos aromáticos. Estudios recientes han reforzado esta teoría ya que han asociado la producción de estos alcoholes (feniletanol, triptofol y tirosol) con la densidad celular, sugiriendo que una alta densidad poblacional estimula la síntesis de alcoholes aromáticos (Avbelj et al., 2015); (Chen & Fink, 2006); (Sprague & Winans, 2006); (Wuster & Babu, 2009).
2. La segunda explicación a la baja producción de triptofol en el mosto bajo en glucosa es que el rápido agotamiento de la glucosa en el mosto bajo en glucosa puede ser también responsable de las bajas cantidades de alcoholes aromáticos producidos (Espinosa Vidal et al., 2015).
3. La tercera explicación es que las diferencias en el metabolismo respiratorio fermentativo puede ser, en parte, responsable de esta baja acumulación (González et al., 2018).

En consecuencia, el periodo de maduración de la uva también parece influir en la concentración de triptofol en el producto fermentado. En concreto, la fermentación de uvas Muller Thurgau cosechadas tardíamente (4/10/2000) obtuvo mayor concentración de este compuesto (≈ 3000 ng/mL) comparado con la que tuvo lugar en la cosecha temprana (≈ 1000 ng/mL) (12/09/2000) (Simat et al., 2004).

1.2.1.3. Propiedades bioactivas del triptofol

Los alcoholes aromáticos como el triptofol pueden actuar como antioxidantes y antimicrobianos (Gañan et al., 2009); (Cueva et al., 2012). En concreto, el triptofol muestra propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas como *Moraxella*

catarrhalis y *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. Las concentraciones a las que se demostró su efecto bioactivo fueron de 137 µg/mL en el caso de la primera bacteria patógena y de 639 µg/mL en el caso de la segunda (Cueva et al., 2012). También el triptofol mostró propiedades antimicrobianas contra *Campylobacter jejuni*, el patógeno bacteriano más común en todo el mundo transmitido por los alimentos. Concretamente, este efecto bioactivo se observó con concentraciones superiores a los 100 mg/L (Gañan et al., 2009).

Además, este compuesto posee un efecto inhibitorio sobre la formación de fibras amiloides, la cual está asociada con una serie de patologías neuronales conocidas como trastornos amiloides (Morshedi et al., 2007). Los depósitos amiloides se encuentran asociados con patologías crónicas neuronales y sistémicas, incluyendo el Alzheimer el Parkinson y la enfermedad de Huntington, la encefalopatía espongiiforme transmisible y la diabetes tipo II (Bajic & Spremo-Potparevic, 2011); (Pepys et al., 2001); (Chiti & Dobson, 2006).

1.2.2. ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO

El ácido 3-indolacético es una de las fitohormonas de la familia de las auxinas más estudiadas (Mas et al., 2014^a); (Simon & Petrášek, 2011) que, en plantas, regula varios procesos de desarrollo y fisiológicos (Teale et al., 2006) así como incrementa la protección de las mismas al estrés externo (Bianco & Defez, 2009). Igualmente, el ácido 3-indolacético actúa como agente regulador de la diferenciación celular microbiana (Rao et al., 2010). A su vez, este compuesto es sintetizado por levaduras a partir de su aminoácido aromático precursor el triptófano durante la fermentación alcohólica de bebidas fermentadas (Žulj et al., 2016); (Fernández-Cruz et al., 2020). Además, es considerado como precursor de 2-aminoacetofenona, un off-flavor que en concentraciones elevadas está relacionada con la percepción organoléptica del defecto comúnmente conocido envejecimiento atípico en vinos (Nardin et al., 2022). Este compuesto es conocido por tener actividad bioactiva, concretamente se han comprobado sus efectos antioxidantes (Kim et al., 2017), anti-angiogénicos (Cerezo et al., 2017), antiproliferativos (Sze et al., 1993) y pro-apoptóticos (Dalmazzo et al., 2011).

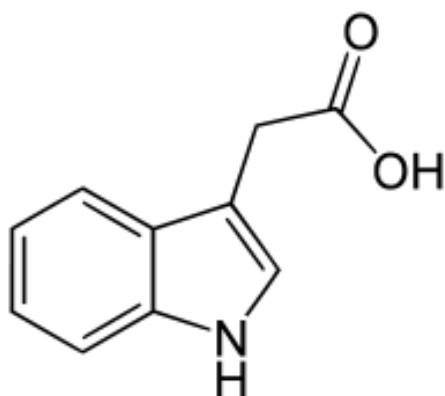


Figura 3. Estructura química del ácido 3-indolacético

Igualmente, el ácido 3-indolacético actúa como agente regulador de la diferenciación celular microbiana (Rao et al., 2010).

El ácido 3-indolacético está presente en bebidas fermentadas como el vino cuyo rango de concentraciones se sitúa entre 13.08 ng/mL y 35.83 ng/mL, de acuerdo con Žulj et al., (2016).

1.2.2.1. Ruta de síntesis

En levaduras el ácido 3-indolacético sigue la misma ruta de síntesis que el triptófol. Se obtiene a partir del aminoácido triptófano y después de las siguientes reacciones: transaminación del triptófano, descarboxilación del indol-3-piruvato y reducción del acetaldehído-3-indol (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014) (Figura 4).

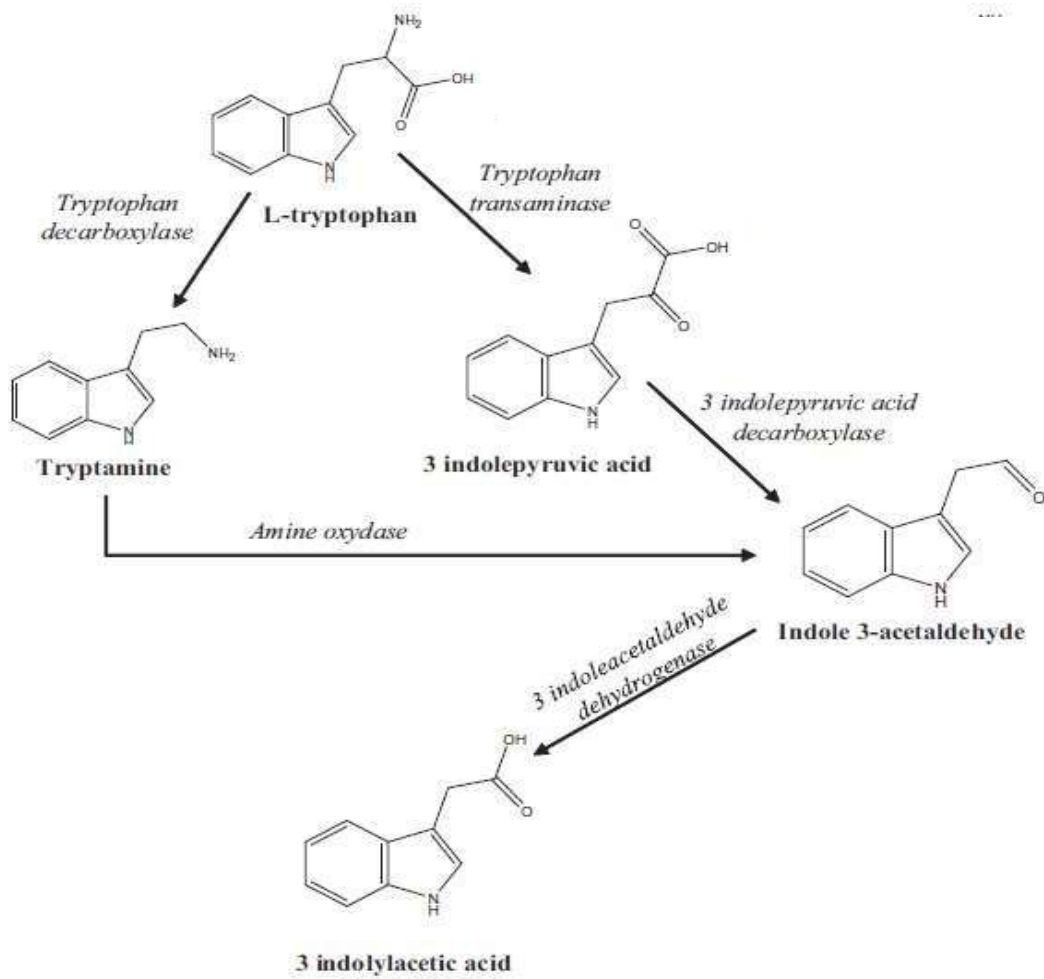


Figura 4. Metabolismo de compuestos indólicos derivados del L-Triptófano (Fernández-Cruz et al., 2017)

1.2.2.2. Condiciones fermentativas para la producción de ácido 3-indolacético

Tabla 4. Condiciones fermentativas para la producción de ácido 3-indolacético

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de ácido 3- indolacético	Referencia
			Fructosa	Glucosa			
Mostos sintéticos fermentados	<i>T. delbrueckii</i> TD291	28	100 g/L	100 g/L	1 de 7 días	≈ 500 ng/mL	Fernández- Cruz et al., 2017
	<i>S. cerevisiae</i> QA23					≈ 75 ng/mL	
	<i>S. cerevisiae</i> y Aroma White	28	100 g/L	100 g/L	1 de 7 días	83.81 ± 1.86 ng/mL	
	0 de 7 días				0.75 ± 0.04 ng/mL		
Mosto de cerveza fermentado	<i>S. cerevisiae</i> Diamond	16			3 de 7 días	≈ 35 ng/mL	Fernández- Cruz et al., 2020
	<i>S. cerevisiae</i> Abbaye	22	-		2 de 7 días	≈ 23 ng/mL	
Vino Tempranillo	<i>S. cerevisiae</i> RF	16- 18		-	2 de 14 días	> 30 ng/mL	Fernández- Cruz et al., 2018
Vino Chardonnay	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White	18		-	1.5 de 14 días	≈ 8 ng/mL	
Zumo de uva de Muller Thurgau fermentado (cosecha temprana)	<i>K. apiculata</i>	24	170 g/L		Mitad-final de la FA	≈ 170 ng/mL	Simat et al., 2004
Zumo de uva de Muller Thurgau fermentado (cosecha temprana)	<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm CM	14	166 g/L		Inicio-mitad de la FA	≈ 60 ng/mL	
Mosto sintético fermentado	<i>T. delbrueckii</i> Tdp	28	100 g/L	100 g/L	Fermentación finalizada	22.63 ± 5.44 ng/10 ⁸ células (intracelular)	Fernández- Cruz et al., 2019
	<i>S. cerevisiae</i> QA23					3.31 ± 0.27 ng/10 ⁸ células (intracelular)	

Fernández-Cruz et al., (2017) manifiestan que el ácido 3-indolacético fue uno de los metabolitos más sintetizados. Las levaduras analizadas en diferentes estudios fueron: *T. delbrueckii* TD291 (≈ 500 ng/mL), *S. cerevisiae* ES488 (≈ 400 ng/mL), *S. cerevisiae* ICV GRE (≈ 300 ng/mL), *S. cerevisiae* Uvaferm BC (≈ 280 ng/mL), *S. cerevisiae* Red Fuit (≈ 220 ng/mL), *M. pulcherrima* Flavia MP346 (≈ 120 ng/mL) y *S. cerevisiae* QA23 (≈ 75 ng/mL) (Fernández-Cruz et al., 2017); *S. cerevisiae* Diamond (≈ 35 ng/mL) y *S. cerevisiae* SafLager (≈ 30 ng/mL) (temperatura de fermentación de 16°C), *S. cerevisiae*

SafAle (≈ 30 ng/mL) y *S. cerevisiae* Abbaye (23 ng/mL) (temperatura de fermentación de 22°C) (Fernández-Cruz et al., 2020).

Las máximas concentraciones de este compuesto (≈ 500 ng/mL y 83.81 ± 1.86 ng/mL), en mosto sintético, se observaron al inicio de la FA (día 1 de 7 días) (Fernández-Cruz et al., 2017); (Fernández-Cruz et al., 2016) (Tabla 4). Fernández-Cruz et al., (2017) declaran que la aparición de la máxima concentración de ácido 3-indolacético al inicio de la fermentación está relacionado con la disminución del L-Triptófano en el medio ya que el ácido 3-indolacético deriva del L-Triptófano. En el estudio de Fernández-Cruz et al., (2017) a partir de este pico máximo, la concentración disminuyó progresivamente hasta el final de la FA. De manera similar, Fernández-Cruz et al., (2016) observaron un aumento significativo en el día 1 y a partir de ahí disminuyó hasta el día 6, no siendo detectado en el día 7. Ese aumento significativo en el día 1 demuestra que las levaduras sintetizaron el ácido 3-indolacético durante la fermentación. De hecho, el ácido 3-indolacético se ha identificado en el medio intracelular en mosto sintético fermentados con la levadura *T. delbrueckii* Tdp (22.63 ± 5.44 ng/10⁸ células), *S. cerevisiae* P24 (6.98 ± 0.88 ng/10⁸ células), *H. uvarum* Hu4 (4.34 ± 2.73 ng/10⁸ células) y *S. cerevisiae* QA23 (3.31 ± 0.27 ng/10⁸ células). La concentración de este compuesto disminuyó ligeramente del inicio de la fase exponencial a la mitad de la misma y luego aumentó hasta alcanzar la máxima concentración ya finalizada la fermentación (22.63 ± 5.44 ng/10⁸ células). La concentración intracelular más baja también apareció ya finalizada la fermentación (3.31 ± 0.27 ng/10⁸ células) (Fernandez-Cruz et al., 2019).

Fernández-Cruz et al., (2017) hipotetizan que su disminución en el mosto durante la fermentación puede estar causada por la conjugación del ácido 3-indolacético con otras estructuras como aminoácidos y restos de azúcares (Hoenicke et al., 2001), ésteres y amidas (Sitbon et al., 1993), así como con el fallo de las levaduras para usar el L-Triptófano en las últimas etapas de la fermentación (Fernández-Cruz et al., 2017). Sitbon et al., (1993) y Hoenicke et al., (2001) resaltaron que el ácido 3-indolacético puede estar conjugado con otros compuestos para proteger la molécula de la oxidación, mostrando una disminución del compuesto libre en los siguientes días (Sitbon et al., 1993); (Hoenicke et al., 2001), lo cual es apoyado por los datos del estudio de Fernández-Cruz et al., (2016) y Fernández-Cruz et al., (2017).

En el mosto de uva natural tuvieron lugar tendencias similares ya que también se encontró la máxima concentración al inicio de la fermentación. Específicamente, en el día 1 la concentración de ácido 3-indolacético fue muy baja, en el mosto de uva Tempranillo, con la levadura RF, alcanzando en el día posterior (día 2 de 14 días) la

máxima concentración (> 30 ng/mL) y bajando posteriormente hasta el final de la fermentación Fernández-Cruz et al., (2018) sostienen que el notable incremento de ácido 3-indolacético durante las primeras etapas de la fermentación en los mostos de uva blancos indica que la producción es debida al metabolismo de la levadura. Varios autores coinciden en que la aparición de este compuesto es dependiente del L-Triptófano (Contreras et al., 2015) (Nutaratat et al., 2016). Sin embargo, Fernández-Cruz et al. (2018) no se ha encontrado esta relación en su estudio.

Simat et al., (2004) examinaron que la concentración máxima de ácido 3-indolacético (\approx 170 ng/mL), en zumos de uvas, apareció tras el inicio de la fermentación. Esta máxima concentración fue superior a las observadas en las etapas de inicio de la fermentación, mitad, final de la fermentación y después de la adición de sulfuroso. Por otro lado, la concentración más baja (\approx 60 ng/mL) apareció tras el inicio de la fermentación (Simat et al., 2004). La variedad de uva es un factor que influyó en la producción de ácido 3-indolacético ya que, con la cepa de levadura *S. cerevisiae* Aroma White, se obtuvieron diferentes concentraciones en diferentes vinos: Vijiriega (> 20 ng/mL), Moscatel (> 20 ng/mL), Corredera (\approx 17 ng/mL), Palomino Fino (\approx 15 ng/mL), Sauvignon Blanc (\approx 10 ng/mL) y Chardonnay (\approx 8 ng/mL) (Fernández-Cruz et al., 2018). La combinación de cepa de levadura y variedad de uva puede ser relevante en la síntesis del ácido 3-indolacético (Fernández-Cruz et al., 2018). Fernández-Cruz et al., (2018) declaran que en el mosto sintético fermentado por la levadura *S. cerevisiae* Aroma White se observó un aumento inicial del compuesto y luego una disminución de la concentración, desde 83.8 ng/mL en el día 1 a < 0.9 ng/mL al final de la FA (Fernández-Cruz et al., 2016). En contraste, estos autores sostienen que Corredera y Palomino Fino presentaron una concentración de 3-indolacético de 16.5 y 14.8 ng/mL, respectivamente, al final de la FA la cual fue significativamente superior a aquella previa a la fermentación (Fernández-Cruz et al., 2018). Igualmente, en un estudio sobre la fermentación de mosto de uva Riesling con cuatro levaduras comerciales (Uvaferm CEG, Lalvin Cross, Anchor VIN y Anchor Exotics SPH), Žulj et al., (2016) observaron un aumento del ácido 3-indolacético durante la FA de 10–35 ng/mL, pero la concentración no disminuyó al final de la fermentación (Žulj et al., 2016).

Otro de los factores que influye sobre la producción del ácido 3-indolacético es la temperatura de fermentación. Simat et al., (2004) mostraron que en uvas cosechadas tempranamente (12/09/2000) la mayor concentración de ácido 3-indolacético tuvo lugar cuando la temperatura de fermentación fue de 24°C comparada con la fermentación a 14°C, mostrando que la temperatura influye sobre la producción de ácido 3-indolacético.

Por otro lado, la concentración de ácido 3-indolacético, en el mosto de cerveza, sigue una tendencia similar a la fermentación del mosto de uva. En el estudio de Fernández-Cruz et al. (2020) el ácido 3-indolacético alcanzó su máxima concentración a mitad de la fermentación (día 3 de 7 días). Esta concentración más elevada fue aproximadamente de 35 ng/mL. Posteriormente, disminuyó progresivamente hasta el final de la fermentación. Según Fernández-Cruz et al., (2020) la disminución del ácido 3-indolacético durante la FA puede estar causada por su unión a aminoácidos o péptidos que las levaduras usan para su metabolismo después de la conveniente hidrólisis intracelular (Simat et al., 2004).

1.2.2.3. Propiedades bioactivas del ácido 3-indolacético

El ácido 3-indolacético es conocido por mejorar la proliferación celular así como por poseer propiedades antioxidantes (Kim et al., 2017). Concretamente, en el estudio de Kim et al., (2017) se verificó que la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en las células madre de la pulpa dental en humanos fue atenuada después del tratamiento con ácido 3-indolacético. Este efecto bioactivo se comprobó con una concentración de alrededor de 150 μM (Kim et al., 2017).

También, este compuesto posee efecto anti-angiogénico ya que inhibe la activación del receptor 2 de VEGF (VEGFR-2), inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular, y la posterior angiogénesis. Esto se comprobó en células endoteliales de cordón umbilical humano con un IC₅₀ de 0.9704 mM y un 54% de inhibición a 1 mM (Cerezo et al., 2017).

Además, posee efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos en las células endoteliales y tumorales (Sze et al., 1993); (Dalmazzo et al., 2011). Específicamente, este compuesto ha sido propuesto como una terapia anticáncer ya que induce apoptosis en las siguientes condiciones: i), en co-tratamiento con anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante, en dos líneas de tumores hematológicos y en células de pacientes con leucemia mieloide aguda y pacientes con leucemia linfocítica crónica (Dalmazzo et al., 2011); ii) en co-tratamiento con peroxidasa de rábano picante en células de carcinoma de vejiga (Greco et al., 2002); iii) irradiado con ultravioleta B en células de cáncer de próstata (Kim et al., 2010); iv) en co-tratamiento con peroxidasa de rábano picante en células de melanoma humano (Kim et al., 2004); y v) en co-tratamiento con la citoquina orto-metoxitopolina-ribósido en células Hela (Zhao et al., 2015). Las concentraciones a las cuales se observaron estos efectos fueron las siguientes: 10 mM (Dalmazzo et al., 2011), 3 mM (Greco et al., 2002), 500 μM (Kim et al., 2010); (Kim et al., 2004) y 1 mM (Zhao et al., 2015).

1.2.3. MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina que está formada por un anillo indólico y cuyos grupos funcionales principales son: un grupo acetyl-amida en posición 2 y un grupo metoxi en posición 5 (Sánchez-Hidalgo et al., 2012). Originalmente, se consideró un producto exclusivo de la glándula pineal de los vertebrados, de hecho, se considera una neurohormona (Mas et al., 2014b); (Tan et al., 2012). Sin embargo, en las últimas dos décadas la melatonina se ha identificado en un amplio rango de invertebrados, plantas, cerveza, vino, etc. (Dubbels et al., 1995); (Maldonado et al., 2009); (Rodríguez-Naranjo et al., 2011); (Vigentini et al., 2015); (Hornedo-Ortega et al., 2016). Por tanto, hoy día es considerada una molécula ubíqua presente en la mayoría de los organismos vivos (Mas et al., 2014b). Su principal función en humanos es la de regular los ritmos circadianos y estacionales (Stege et al., 2010); (Morera & Abreu, 2006); (Reiter, 1993); (Reiter et al., 2014) como el ciclo de vigilia/sueño (Iriti & Varoni, 2015) por lo que también se utiliza como complemento alimenticio o incluso como medicamento (a dosis superiores a 2 mg) para mitigar los desórdenes del sueño (Reiter, 1993).

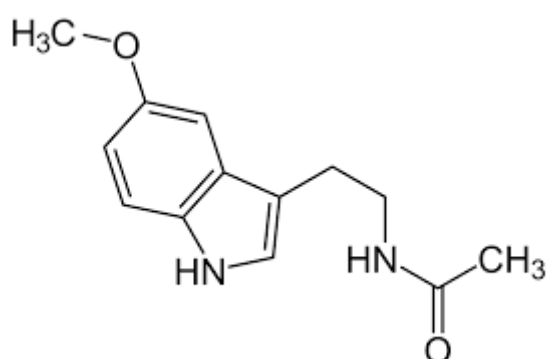


Figura 5. Estructura química de la melatonina

La Comisión Europea ha autorizado dos declaraciones de propiedades saludables para la melatonina basadas en las opiniones científicas de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en relación con su contribución al alivio de sensaciones subjetivas de la descompensación horaria (jet lag) (dosis diaria mínima de 0.5 mg) y la reducción de la latencia de inicio del sueño (dosis diaria de 1 mg) (EFSA, 2010); (EFSA, 2011).

La síntesis de melatonina por levaduras ha sido demostrada en varios estudios identificándose en el compartimento intracelular de varias levaduras: *S. cerevisiae* QA23

(1.38 ng/mL); (\approx 1400 ng/mL) (Morcillo-Parra et al., 2019); (Morcillo-Parra et al., 2020), *S. cerevisiae* SafLager (\approx 0.08 ng/10⁹ células), *S. cerevisiae* Abbaye (\approx 0.04 ng/10⁹ células), *S. cerevisiae* SafAle (\approx 0.02 ng/10⁹ células) (Fernández-Cruz et al., 2020), *T. delbrueckii* Tdp CECT13135 (0.66 ± 0.43 ng/10⁸ células) y *H. uvarum* Hu4 CECT13130 (0.93 ± 1.11 ng/10⁸ células) (Fernández-Cruz et al., 2019). Como consecuencia, la melatonina ha sido cuantificada en varios alimentos fermentados como el yogur probiótico (126.7 pg/g) (Kocadağlı et al., 2014) y masa de pan fermentada (0.63 ng/g) (Yilmaz et al., 2014). Además, también está presente en bebidas fermentadas como el vino (0.05-423 ng/mL), (Vitalini et al., 2013); (Rodríguez-Naranjo et al., 2011); (Rodríguez-Naranjo et al., 2011); (Rodríguez-Naranjo et al., 2012), la cerveza (0.05-0.17 ng/ml) (Maldonado et al., 2009) y el zumo de naranja fermentado (20 ng/mL) (Fernández-Pachón et al., 2014).

1.2.3.1. Ruta de síntesis

Existen diferencias en la ruta de síntesis de la melatonina en animales, plantas y levaduras:

En los animales, el precursor de la melatonina, el L-triptófano es hidroxilado para formar 5-hidroxitriptófano. Después, una descarboxilasa transforma el 5-hidroxitriptófano en serotonina (5-hidroxitriptamina) y luego en N-acetilserotonina. El último paso en esa ruta consiste en la formación de la melatonina a través de la acción de la metiltransferasa (Tan et al., 2014) (Figura 6).

Por otro lado, en las plantas la ruta de síntesis difiere de la de los animales en una parte (Figura 6). En vez de ser la hidroxilación del triptófano el primer paso en la producción de melatonina, primero el triptófano es descarboxilado para formar triptamina y luego la triptamina es hidroxilada para formar serotonina. Los dos últimos pasos de la ruta son similares a la de los animales (Tan et al., 2014).

Las levaduras como *S. cerevisiae* son capaces de metabolizar el L-triptófano para producir melatonina. Se observó que la levadura *S.cerevisiae* podía formar melatonina en un medio de crecimiento simple (Sprenger et al., 1999) y después en productos fermentados como la cerveza (Maldonado et al., 2009), el vino (Stege et al., 2010); (Rodríguez-Naranjo et al., 2011); (Mecoloni et al., 2012) y el pan (Yilmaz et al., 2014).

La biosíntesis de melatonina en levaduras parece ser similar a aquella descrita en vertebrados (Sprenger et al., 1999). Concretamente, el triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano, después el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado a serotonina y luego

la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina. Finalmente, la melatonina es sintetizada por transmetilación (Mas et al., 2014); (Sprenger et al., 1999) (Figura 6).

Sin embargo, un estudio posterior informó que las levaduras *S. cerevisiae* poseían una actividad descarboxilasa limitada para la conversión de 5-hidroxitriptófano en serotonina (Park et al., 2008). Esto sugirió que posiblemente la síntesis de melatonina no utilice en su ruta la conversión de serotonina en N-acetilserotonina, dando lugar a una ruta alternativa para la síntesis de melatonina a partir del L-triptófano vía 5-metoxitriptamina (Tan et al., 2016) (Figura 6).

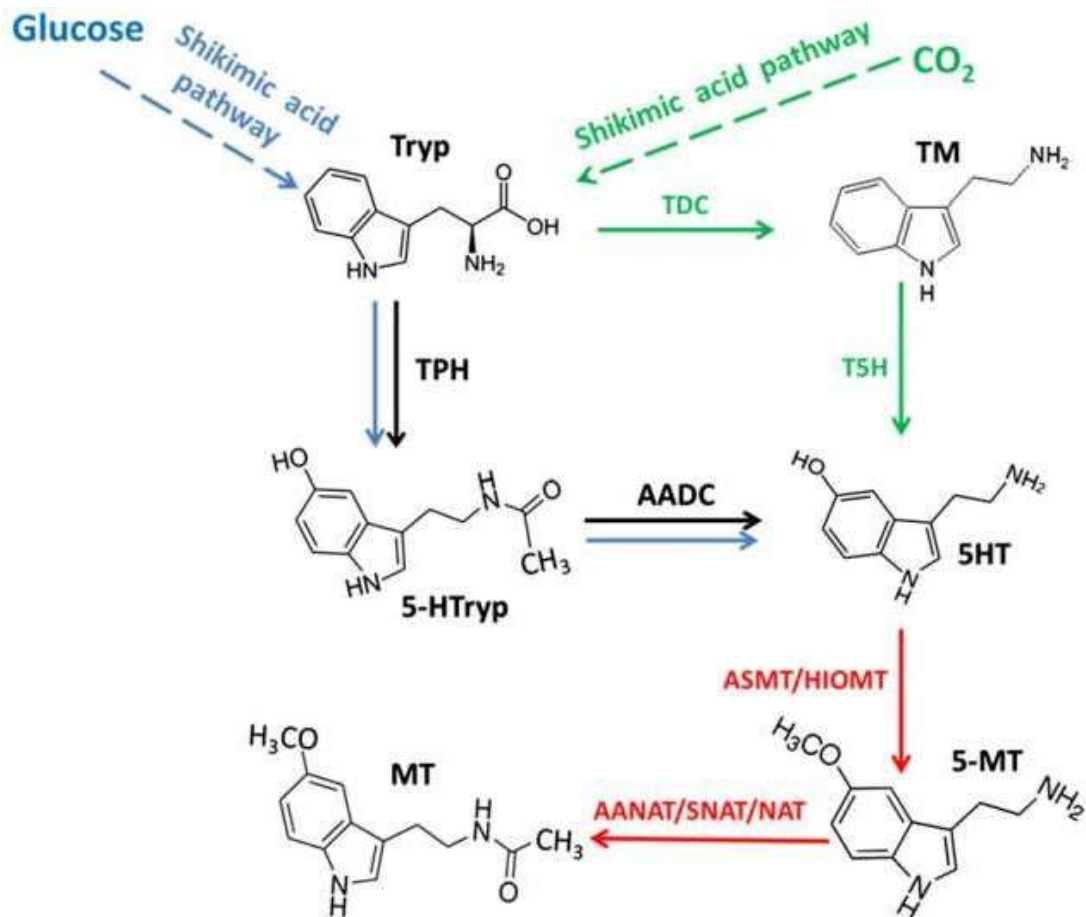


Figura 6. Rutas de síntesis de la melatonina en animales, plantas, levaduras y la ruta alternativa de síntesis (Tan et al., 2016). El color verde representa la parte única de la vía de síntesis de la melatonina en las plantas; el color negro representa esta parte en los animales; el color azul representa la ruta en la levadura, y el color rojo representa la hipotética predominante ruta de síntesis de la melatonina. Tryp, triptófano; 5-HTryp, 5-hidroxi triptófano; TM, triptamina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); MT, melatonina; TPH, triptófano 5-hidroxilasa; AADC, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; CCT, triptófano descarboxilasa; T5H, triptamina 5-hidroxilasa; AANAT / SNAT / NAT, arilalquilamina N-acetiltransferasa / serotonina N-acetiltransferasa también conocida como arilamina N-acetiltransferasa / arilamina-N-acetiltransferasa; HIOMT / ASMT, hidroxiindol-O-metiltransferasa / también conocida como N-acetilserotonina O metiltransferasa

1.2.3.2. Condiciones fermentativas para la producción de melatonina

Rodríguez-Naranjo et al., (2012) demostraron que la presencia de triptófano condiciona la síntesis de melatonina ya que es su principal precursor y que su aumento incrementa el contenido final de melatonina. Concretamente, en este estudio el contenido más alto de melatonina, con la levadura *S. cerevisiae* QA23, al final de la FA (24 h) tuvo lugar en el mosto sintético con 5 veces más de triptófano (Rodríguez-Naranjo et al., 2012). Rodríguez-Naranjo et al., (2011) observaron que la melatonina apareciera más temprano en las muestras en las que el triptófano había sido añadido (0.87 g/L). Sprenger et al., (1999) mostraron que un corto período de exposición al triptófano (30 minutos) aumentó la melatonina a niveles detectables. Estos autores también comprobaron que la melatonina aparece más rápidamente cuando hay un precursor (triptófano, serotonina o N-acetilserotonina) en el medio de crecimiento que cuando no hay precursor (Sprenger et al., 1999).

Sin embargo, en el estudio de Rodríguez-Naranjo et al., (2011) se observó que incluso aunque el triptófano fue añadido, el contenido en melatonina fue similar cuando la misma variedad, condiciones y levaduras fueron usadas. Además, en el estudio de Fernández-Cruz et al., (2016), a pesar de que la serotonina es el precursor de la melatonina, continúa aumentando mientras que la melatonina aparece en muy pequeña cantidad.

La melatonina fue sintetizada por las siguientes cepas de levaduras en diferentes estudios: *S. cerevisiae* RF (2.24 ng/mL), *S. cerevisiae* ES488 (≈ 1.6 ng/mL), *S. cerevisiae* QA23 (≈ 1.45 ng/mL), *T. delbrueckii* Biodiva TD291 (≈ 1 ng/mL) y *M. pulcherrima* Flavia MP346 (≈ 0.95 ng/mL) (Fernández-Cruz et al., 2017); *H. uvarum* Hu4 y *T. delbrueckii* Tdp (Fernández-Cruz et al., 2019); *S. cerevisiae* BM45 (12.98 ± 3.34 ng/mL), *S. cerevisiae* P8 (11.74 ± 1.71 ng/mL), *S. cerevisiae* EC1118 (11.01 ± 0.74 ng/mL), *S. cerevisiae* Premium Zinfandel (9.24 ± 0.98 ng/mL), *S. cerevisiae* R6 (6.23 ± 0.87 ng/mL) y *S. cerevisiae* Zymaflore VL1 (5.34 ± 0.53 ng/mL) (Guerrini et al., 2018) y *S. cerevisiae* Abbaye (0.22 ng/mL) (temperatura de fermentación de 22°C) (Fernández-Cruz et al., 2020).

Por el contrario, este compuesto no fue sintetizado por las levaduras *S. cerevisiae* Uvaferm BC y *S. cerevisiae* ICV GRE (Fernández-Cruz et al., 2017); *S. cerevisiae* Diamond, *S. cerevisiae* SafLager y *S. cerevisiae* SafAle (Fernández-Cruz et al., 2020).

Fernández-Cruz et al., (2017) observaron que varias cepas de levaduras demostraron diferentes capacidades para formar melatonina ya que, las levaduras *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* no formaron melatonina hasta el día 4, coincidiendo con

bajos niveles de L-triptófano en el medio en el punto medio de la fase estacionaria. Concretamente, Fernández-Cruz et al., (2017) detectaron el máximo de producción de melatonina para las levaduras *Saccharomyces* después de dos días de fermentación mientras que las no-*Saccharomyces* tardaron más tiempo en alcanzar la máxima concentración de melatonina (día 6).

En los diferentes estudios, la melatonina apareció y desapareció a lo largo de toda la FA, mostrando una tendencia en zig-zag. El momento de la FA en el que tuvo lugar una mayor producción de melatonina (2.24 ng/ml y 0.14 ± 0.00 ng/mL) en el medio extracelular, en el mosto sintético, fue al inicio (Fernández-Cruz et al., 2017); (Fernández-Cruz et al., 2016) (Tabla 5). Otros autores como Rodríguez-Naranjo et al., (2011) y Vigentini et al., (2015) también observaron la máxima concentración de melatonina al inicio de la FA. Según Fernández-Cruz et al., (2016) parece estar directamente relacionada con el crecimiento celular en el día 2, cuando también alcanza su valor máximo. Declaran que otros autores también han detectado melatonina desde el día 2, sin embargo, su concentración permaneció constante durante el proceso de fermentación (Gomez et al., 2012). Sin embargo, las menores concentraciones (0.04 ± 0.01 ng/mL y ≈ 0.95 ng/mL) se obtuvieron en diferentes momentos de la FA: mitad (Fernández-Cruz et al., 2016) y final (Fernández-Cruz et al., 2017).

Tabla 5. Condiciones fermentativas para la producción de melatonina

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de melatonina	Referencia
			Fructosa	Glucosa			
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> RF	28	100 g/L	100 g/L	2 de 7 días	2.24 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2017
	<i>M. pulcherrima</i> Flavia MP346				7 de 7 días	≈ 0.95 ng/mL	
	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White	-	100 g/L	100 g/L	2 de 7 días	0.14 ± 0.00 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2016
					4 de 7 días	0.04 ± 0.01 ng/mL	
	<i>S. cerevisiae</i> BM45	28	200 g/L		Final	12.98 ± 3.34 ng/mL	Guerrini et al., 2018
<i>S. cerevisiae</i> Zymaflore VL1	5.34 ± 0.53 ng/mL						
Mosto de cerveza fermentado	<i>S. cerevisiae</i> Abbaye	22			2 de 7 días	0.22 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2020
-	-	-			-	-	
Vino Syrah	<i>S. cerevisiae</i>				Etapa de trasvasado	423.0 ± 1.60 ng/mL	Rodríguez-Naranjo et al., 2011
Vino Cabernet Sauvignon	Actiflore F5 y <i>O. lacti</i>	27 ± 1			Etapa de prensado	74.13 ± 2.65 ng/mL	

Vino Tintilla de Rota	<i>S. cerevisiae</i> Actiflore F5 y <i>O.</i>	27 ±	26.3 °Bx		Etapa de trasvasado	18 ng/mL	Rodríguez-Naranjo et al., 2013
Vino Syrah	<i>oeni</i>	1	24.5 °Bx		Etapa de estabilización	≈ 0.2 ng/mL	
Vino Moscatel	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White	18	-		4 de 14 días	≈ 0.8 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2018
Vino Sauvignon Blanc					5 de 14 días	≈ 0.15 ng/mL	
Mosto sintético fermentado	<i>H. uvarum</i> Hu4	28			Inicio fase exponencial	0.93 ± 1.11 ng/10 ⁸ células (intracelular)	Fernández-cruz et al., 2019
	<i>T. delbrueckii</i> Tdp				Mitad fase exponencial	0.66 ± 0.43 ng/10 ⁸ células (intracelular)	
Mosto sintético fermentado a 12°C		12				≈ 1400 ng/mL (intracelular)	Morcillo-Parra et al., 2020
Mosto sintético inoculado con 10⁸ células	<i>S. cerevisiae</i> QA23	28	100 g/L	100 g/L		≈ 0 ng/mL (intracelular)	
Mosto sintético fermentado					1 h de 96 h	1.38 ng/mL (intracelular)	
					0-12 h de 96 h	≈ 0.2 ng/mL (intracelular)	Morcillo-Parra et al., 2019
						≈ 0.08 ng/10 ⁹ células (intracelular)	
Mosto de cerveza fermentado	<i>S. cerevisiae</i> Saflager	16			3 de 7 días	≈ 0.02 ng/10 ⁹ células (intracelular)	Fernández-Cruz et al., 2020
	<i>S. cerevisiae</i> SafAle	22				≈ 0.02 ng/10 ⁹ células (intracelular)	

En el estudio de Fernández-Cruz et al., (2018) la acumulación de melatonina siguió dos tendencias durante la FA a pesar del uso de la misma cepa de levadura. Observaron una tendencia en zig-zag para la concentración de melatonina en Corredera y Moscatel mientras que la concentración de melatonina permaneció constante durante la FA de Chardonnay, Sauvignon Blanc y Vijiriega (E. Fernández-Cruz et al., 2018). Estos autores observaron que el vino Moscatel (≈ 0.8 ng/mL) resultó en una mayor concentración de melatonina en comparación con los vinos Corredera, Chardonnay, Palomino Fino, Vijiriega y Sauvignon Blanc (≈ 0.15 ng/mL) (Fernández-cruz et al., 2018). En este estudio, más de un pico en la producción de melatonina fue encontrado durante la FA. Estos resultados muestran una notable diferencia entre los sustratos estudiados, lo que resulta en que cada cultivo presenta una tendencia diferente en la producción de melatonina (Fernández-Cruz et al., 2018).

De acuerdo con Rodríguez-Naranjo et al., (2012) la concentración de melatonina fue dependiente de la fase de crecimiento de la levadura. Concretamente, mantienen que

la primera parte de la fase de crecimiento (0-4 h) puede ser de alguna manera crucial para la levadura ya que solo las moléculas esenciales fueron formadas mientras que la levadura se estaba adaptando a las condiciones en el nuevo medio. En esta fase temprana, la melatonina no fue sintetizada. Después de 8 h, la melatonina ya no aumentó. Posteriormente, cuando la maquinaria metabólica estaba trabajando para soportar el crecimiento exponencial de la levadura, la acumulación de la melatonina fue bastante constante. Luego, en la fase estacionaria, la síntesis de melatonina por las células fue mayor y su concentración alcanzó un pico a las 26 h. Finalmente, en la fase de declive los niveles de melatonina disminuyeron (Rodríguez-Naranjo et al., 2012).

En el medio intracelular la melatonina también siguió una tendencia en zig-zag. Las mayores concentraciones (1.38 ng/mL y 0.93 ± 1.11 ng/10⁸ células), en el mosto sintético, también tuvieron lugar al inicio de la FA (Morcillo-Parra et al., 2019) y al inicio de la fase exponencial (Fernández et al., 2019). Por otro lado, las menores concentraciones (≈ 0.2 ng/mL y 0.66 ± 0.43 ng/10⁸ células) se encontraron al inicio de la FA (Morcillo-Parra et al., 2019) y a mitad de la fase exponencial (Fernández-Cruz et al., 2019).

Fernández-Cruz et al., (2019) sugieren que las diferencias observadas en la síntesis intracelular de melatonina pueden ser determinadas por la conocida capacidad diferencial en la absorción de carbono y fuentes de nitrógeno de los mostos de uva entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Curiel et al., 2017). Mantienen que recientemente, González et al., (2018) han informado de que la ruta de Ehrlich es igualmente activa en las levaduras no-*Saccharomyces* que producen alcoholes aromáticos durante la FA, aunque su regulación parece ser algo diferente de las *S. cerevisiae* (González et al., 2018).

Al igual que en el mosto sintético, en el mosto de uva natural la melatonina también tuvo una tendencia en zig-zag y tuvo lugar la mayor concentración (≈ 0.8 ng/mL) al inicio de la FA (Fernández-Cruz et al., 2018), en Vino Moscatel. Por otro lado, la mínima concentración (≈ 0.15 ng/mL) fue también al inicio de la fermentación, en el vino Sauvignon Blanc (Fernández-Cruz et al., 2018).

En los estudios de Rodríguez-Naranjo et al., (2011) y Rodríguez-Naranjo et al., (2013) las mayores concentraciones (423.0 ± 1.60 ng/mL y 18 ng/mL) tuvieron lugar en la etapa de trasvasado del vino en comparación con el mosto inicial, la etapa de prensado y la etapa de dejuice en los vinos blancos (Rodríguez-Naranjo et al., 2011) y en comparación con la etapa 1 de cosecha, la etapa 2 de densidad de 1020 g/L (FA), la etapa 3 de

prensado y la etapa 5 de estabilización (almacenamiento) (Rodríguez-Naranjo et al., 2013). Por otro lado, las menores concentraciones (74.13 ± 2.65 ng/mL y ≈ 0.2 ng/mL) tuvieron lugar en la etapa de prensado del vino (Rodríguez-Naranjo et al., 2011) y en la etapa de estabilización (Rodríguez-Naranjo et al., 2013). En este caso, la concentración aumentó hasta alcanzar su máximo en la etapa 4 y a partir de ahí disminuyó hasta la etapa 5 (Rodríguez-Naranjo et al., 2013).

En el mosto de cerveza fermentado, la melatonina solo apareció, en el medio extracelular, al inicio de la FA, cuya concentración fue de 0.22 ng/mL (Fernández-Cruz et al., 2020). Por otro lado, en el medio intracelular, la melatonina siguió un patrón en zig-zag y tanto la máxima (≈ 0.08 ng/ 10^9 células) como la mínima concentración (≈ 0.02 ng/ 10^9 células) aparecieron a mitad de la fermentación con las levaduras *S. cerevisiae* Saflager y *S. cerevisiae* SafAle, respectivamente (Fernández-Cruz et al., 2020).

Según Morcillo-Parra et al., (2019) la melatonina fue producida intracelularmente en la fase de latencia del crecimiento de la levadura y fue exportada al medio extracelular durante la fase estacionaria. Declaran que, dada la diferencia entre la producción intracelular y la detección extracelular de la melatonina, una posible interacción con algunas moléculas dentro de la célula, como proteínas, podría ser responsable de esta diferencia en la secreción de melatonina. Manifiestan que esta interacción podría ser parte de su transporte al medio extracelular o estar relacionada con una posible función señalizadora de esta molécula durante el crecimiento de la levadura (Morcillo-Parra et al., 2019).

Rodríguez-Naranjo et al., (2011) observaron que, entre vinos comerciales de diferentes variedades, hubo diferencias significativas en la concentración de melatonina, incluso cuando la levadura y las condiciones fueron idénticas. Concretamente, estos autores encontraron la mayor concentración (423.0 ± 1.60 ng/mL) en el vino tinto Syrah en comparación con los vinos tintos Merlot, Tempranillo y Tintilla de Rota, Palomino Fino y Cabernet Sauvignon. Por otro lado, la menor concentración (74.13 ± 2.65 ng/mL) tuvo lugar en el vino Cabernet Sauvignon. Sin embargo, en el estudio de Rodríguez-Naranjo et al., (2013), en el cual se fermentaron los mismos mostos de uva, la mayor concentración de melatonina (18 ng/mL) se observó en el vino tinto Tintilla de Rota en comparación con los vinos tintos Merlot, Syrah y Tempranillo y con el vino blanco Palomino Fino. Por otro lado, la menor concentración de este compuesto se observó en el vino Syrah (≈ 0.2 ng/mL).

Otros factores que influyen en la producción de melatonina son las temperaturas de fermentación (Morcillo-Parra et al., 2020); (Torija et al., 2003), la cantidad de células

inoculadas (Morcillo-Parra et al., 2020), la composición del mosto (Rodríguez-Naranjo et al., 2012), la limitación en glucosa (Morcillo-Parra et al., 2020), el grado de alcohol del vino (Rodríguez-Naranjo et al., 2013); (Tan et al., 2012) y las condiciones climatológicas (Rodríguez-Naranjo et al., 2013).

De acuerdo con Morcillo-Parra et al., (2020) la temperatura es un factor importante durante la fermentación el cual afecta a su desarrollo, así como al crecimiento de la levadura, siendo la FA más lenta a temperaturas más bajas (13°C y 25°C); (Torija et al., 2003). El mosto sintético fermentado a una temperatura de 12°C resultó en una mayor concentración intracelular de melatonina (≈ 1400 ng/mL) cuando se comparó con un mosto fermentado a 4°C (Morcillo-Parra et al., 2020).

Respecto a la cantidad de células inoculadas, de acuerdo con Morcillo-Parra et al., (2020), un alto tamaño del inóculo genera un menor crecimiento de las células (Carrau et al., 2010). Este retraso en la síntesis de melatonina podría añadir más evidencias para señalar que la melatonina es una molécula señal para el crecimiento de la levadura (Morcillo-Parra et al., 2020). En concreto, Morcillo-Parra et al., (2020) observaron una mayor concentración de melatonina en el mosto inoculado con 10^7 células que en el inoculado con 10^8 células (≈ 0 ng/mL).

En el estudio de Rodríguez-Naranjo et al., (2012) el medio de crecimiento limitó la producción de melatonina. Concretamente, según estos autores la levadura *S. cerevisiae* QA23 fue la mayor productora de melatonina en condiciones de crecimiento cuando el medio inicial tuvo una concentración baja de azúcares residuales (20 g/L), sin embargo, no fue capaz de sintetizar melatonina durante la FA (200 g/L azúcares residuales). Además, observaron que las levaduras *S. uvarum* S6u y *S. cerevisiae* Uvaferm BC sí formaron melatonina en el mosto sintético bajo condiciones de fermentación. Por lo tanto, mantienen que tanto la composición del mosto como la cepa de levadura determinaron igualmente la concentración de melatonina en vinos (Rodríguez-Naranjo et al., 2012).

Morcillo-Parra et al., (2020) mantienen que la limitación de glucosa también afecta al perfil de la síntesis de melatonina durante la FA. Proponen el estrés osmótico como responsable de la síntesis de melatonina intracelular, pero también un cambio en el metabolismo del carbono de la levadura debido a la concentración baja en azúcar. De hecho, resultados recientes de este grupo han mostrado que la melatonina interacciona con algunas proteínas glicolíticas (enolasa, fructosa bifosfato aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa, etc.) en la levadura con una alta

capacidad fermentativa, señalando que su posible papel como molécula señal probablemente está relacionado con el metabolismo fermentativo (Morcillo-Parra et al., 2019); (Morcillo-Parra et al., 2020). Por lo tanto, la cantidad de azúcar presente en el medio, el cual puede determinar el metabolismo de los azúcares en la levadura, podría ser la responsable de la presencia de melatonina en el producto final (Morcillo-Parra et al., 2020).

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Rodríguez-Naranjo et al., (2013) que determinaron la mayor concentración de melatonina (18 ng/mL), con respecto a vinificaciones con otras variedades (Merlot, Syrah, Tempranillo y Palomino Fino), siendo la principal característica de los vinos de la variedad Tintilla de Rota, un grado alcohólico mayor (16.02 %vol.) (Rodríguez-Naranjo et al., 2013). Tan et al., (2012) discutieron que el etanol formado durante la FA sería un factor estresante para *Saccharomyces* para sintetizar melatonina.

Los resultados del estudio de Rodríguez-Naranjo et al., (2013) soportan que las condiciones climatológicas influyen sobre el contenido final de melatonina en vinos, probablemente porque diferentes condiciones cambian la concentración de azúcar de los mostos. Específicamente, Rodríguez-Naranjo et al., (2013) realizaron fermentaciones con las mismas variedades, crecidas en el mismo viñedo y con un proceso de elaboración del vino idéntico en 2008 y en 2010. Las concentraciones de melatonina en 2008 son también muy similares para todas las variedades involucradas, pero fueron 50 veces superiores a los encontrados en el estudio de 2010 (307 ng/mL en 2008 y 5.5 ng/mL en 2010 para la variedad Tempranillo) (Rodríguez-Naranjo et al., 2011).

1.2.3.3. Propiedades bioactivas de la melatonina

Este compuesto es de especial relevancia por su bioactividad en organismos superiores, incluidos los humanos (González et al., 2018). En concreto, posee propiedades antioxidantes (Bonfont-Rousselot & Collin, 2010); (Tan et al., 2010); (Tan et al., 2005); (Iriti & Varoni, 2015) que incluyen acciones directas de captación de radicales libres (Reiter et al., 2007) y acciones estimulantes indirectas sobre una variedad de enzimas antioxidantes (Reiter et al., 2009); (Reiter et al., 2005); (Hardeland & Pandi-Perumal et al., 2005) que promueven más su capacidad para reducir la toxicidad de los radicales y sus reactivos asociados (Reiter et al., 2005). Además de interactuar de manera eficiente con varias especies de oxígeno reactivo y nitrógeno reactivo y aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes, también reduce la actividad de las enzimas prooxidantes (Reiter et al., 2007).

Como antioxidante, se ha descubierto que la melatonina es particularmente eficaz para reducir el daño al ADN causado por los radicales libres (Fernández-Mar et al., 2012). Además, podría tener un efecto sinérgico con otros antioxidantes como el resveratrol (Kwon et al., 2011). De hecho, ambos compuestos han demostrado un fuerte efecto protector contra el daño al ADN causado por carcinógenos como el Cr(III) (Burkhardt et al., 2001) y el KBrO₃ (Cadenas & Barja, 1999). La melatonina inhibió la formación de 8-OH-dG inducida por el Cr(III) de forma dependiente de la dosis. Las concentraciones efectivas de melatonina oscilaron entre 0.01 y 10 µM (Burkhardt et al., 2001). Por otro lado, después de consumir una dosis de 300 mg de melatonina, los linfocitos en muestras de sangre humana mostraron un descenso significativo en la incidencia de las anomalías cromosómicas y de los micronúcleos (Vijayalaxmi et al., 1996).

Los efectos antioxidantes de la melatonina no están asociados con un ciclo redox típico sino con una cascada de metabolitos que contribuye a las actividades antioxidantes (Tan et al., 2000); (Tan et al., 2007). Estos efectos antioxidantes también se han correlacionado con una mayor longevidad en ratas (Oaknin-Bendahan et al., 1995) y ratones (Nogués et al., 2006) y el desarrollo de mecanismos protectores contra mutaciones en hamsters (Karbownik et al., 2001).

Asimismo, la melatonina posee actividad anticancerígena (Maestroni et al., 1994); (Sainz et al., 2003). Concentraciones entre 10 nM y 1 µM de melatonina fueron capaces de prevenir la apoptosis en células de la médula ósea incubadas con etopósido (fármaco citostático) en ratones (Maestroni et al., 1994). Regula la expresión génica de varias citoquinas inmunomoduladoras, incluido el factor de necrosis tumoral-α (TNF α), el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y el factor de células madre (SCF) por los macrófagos peritoneales, así como los niveles de interleucina-1β (IL-1β) y el interferón gamma (INFγ), entre otros (Liu et al., 2001). Si de hecho los niveles fisiológicos de melatonina normalmente restringen el crecimiento tumoral, la reducción en la producción de melatonina asociada con la edad puede contribuir a la mayor frecuencia de cáncer en la población mayor (Fernández-Mar et al., 2012).

Asimismo, la melatonina también influye en el sistema inmune (Haldar et al., 1992). Tiene como función la mejora inmunológica (Tan et al., 2010) y también es beneficiosa para el sistema inmunológico, mejorando la resistencia a la infección y a enfermedades, presentando actividad inhibitoria en algunos cánceres e induciendo efectos beneficiosos en trastornos neuronales (Posmyk & Janas, 2009).

La mayoría de los efectos de la melatonina sugieren una clara actividad neurohormonal, lo que ha permitido relacionar su presencia con procesos de aprendizaje y de memoria

(Larson et al., 2006), envejecimiento y tratamiento de la enfermedad del Alzheimer (Pappolla et al., 1997); (Pohanka, 2011), esclerosis lateral amiotrófica (Jacob et al., 2002) o migraña (Dodick & Capobianco, 2001). Además tiene efecto protector putativo contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Hornedo-Ortega et al., 2016). Concretamente, la administración de 10 mg/kg de melatonina, en ratones, fue adecuada para la supresión de algunos procesos perjudiciales en el sistema nervioso. También desencadenó la regulación al alza del nivel ROR α 1 (Caballero et al., 2008). La administración crónica de melatonina (10 mg/kg) también tuvo otro efecto significativo en ratones SAMP8: reducción de la pérdida de células y daño oxidativo de macromoléculas (Gutierrez-Cuesta et al., 2007).

La melatonina también ha demostrado ser una molécula cardioprotectora y anticancerígena por su efecto antiangiogénico (Alvarez-García et al., 2013a). Por un lado, inhibe la angiogénesis (síntesis de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes) indirectamente mediante la disminución de la expresión y la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en las células tumorales (Cui et al., 2012); (Alvarez-García et al., 2013b). Específicamente, 1 mM de melatonina añadida a los cultivos disminuyó el crecimiento de HUVEC y sólo esta concentración tuvo un inhibidor efecto sobre la proliferación celular (Cui et al., 2012). Por otro lado, se ha propuesto que inhibe directamente la angiogénesis al inhibir la proliferación de las células endoteliales (Cui et al., 2008); (Cui et al., 2006). En el estudio de Cerezo et al., (2017) muestra el potencial de la melatonina para inhibir la activación del VEGFR-2, que es el principal mediador de la proliferación, migración, supervivencia y permeabilidad en las células endoteliales (Holmes et al., 2007). En concreto, la melatonina mostró un 30% de inhibición a 1 mM (Cerezo et al., 2017). Igualmente, Álvarez-García et al., (2013) demostraron que la melatonina reducía la proliferación, la invasión, la migración y la formación de tubos de las células endoteliales de la vena umbilical humana.

El tratamiento con melatonina previno parcialmente del aumento del tejido adiposo, del peso, de la insulinemia, de la glucemia y del colesterol, y redujo la ingesta de comida (Prunet-Marcassus et al., 2003); (Sanchez-Mateos et al., 2007); (López-Olmeda et al., 2006); (Pinillos et al., 2001). Respecto a la reducción en la ingesta de comidas, la ingesta de alimentos acumulada a las 8 h después de la inyección de melatonina indica que la melatonina intraperitoneal administrada (20 y 200 μ g /g peso seco) a medianoche redujo significativamente la alimentación en peces de colores (Pinillos et al., 2001). Por otro lado, López-Olmeda et al., (2006) observaron que dosis de melatonina de 3 y 30 mg/kg inhibieron la ingesta de alimentos en un grado similar (16% y 14% de inhibición,

respectivamente), lo que indicó que el efecto de la melatonina no era dependiente de la dosis dentro de este rango.

Aparte de todo lo mencionado, esta molécula tiene otras funciones como la señalización fotoperiódica y la regulación reproductiva (Tan et al., 2010) y tiene potencial para prevenir y tratar enfermedades cardiovasculares (Girotti et al., 2003); (Dominguez-Rodriguez et al., 2010). En concreto, se ha demostrado que la melatonina suprime la formación de colesterol en un 38% y reduce la acumulación de las LDL en un 42% en leucocitos mononucleares recién aislados en humanos (Müller et al., 1994).

Además, se la ha relacionado funcionalmente con la fisiología de la retina ya que preserva las funciones visuales (Siu et al., 2006) y podría tener un papel como factor de crecimiento (Posmyk & Janas, 2009). En un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo se observó que la melatonina podría reducir la presión arterial en hombres con hipertensión crónica (Scheer et al., 2004).

También se ha evaluado su efecto en el tratamiento con quimioterapias estándar. Específicamente, la administración de melatonina, cuando se combina con quimioterapias estándar, a menudo mejora la calidad de vida. Esto probablemente esté relacionado con la capacidad de la melatonina para reducir la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos (Fernández-Mar et al., 2012). Además, los pacientes que reciben melatonina logran y mantienen un mejor estado funcional y también tienen menos ansiedad que aquellos tratados sin melatonina (Fernández-Mar et al., 2012).

1.2.4. SEROTONINA

La serotonina, 5-hidroxitriptamina, es un neurotransmisor y un precursor de la síntesis de melatonina (Vilela, 2019); (Hornedo-Ortega et al., 2016). La serotonina es un neurotransmisor involucrado en la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto de energía, que está presente en neuronas propiomelanocortina arqueadas seleccionadas (Nonogaki et al., 1998); (Xu et al., 2008). También juega un importante papel modulador en el comportamiento sexual (Uphouse & Guptarak, 2010); (Olivier et al., 2019) y controla la temperatura corporal causando, en el artículo de Bligh (1979), un aumento en la producción de calor y/o una disminución en la pérdida de calor y, por lo tanto, un aumento en la temperatura central en gatos (Bligh, 1979) así como controla los ritmos circadianos ya que el agotamiento agudo de serotonina en el cerebro conduce a una interrupción de los ciclos diurnos de sueño-vigilia y la actividad locomotora en ratas (Nakamaru-Ogiso et al., 2012). Igualmente, los receptores de serotonina se encuentran en las regiones del cerebro involucradas en el aprendizaje y la memoria

(Meneses,1999). Además, una síntesis baja de serotonina está asociada con un humor depresivo (Young & Leyton, 2002); (Toker et al., 2010) .

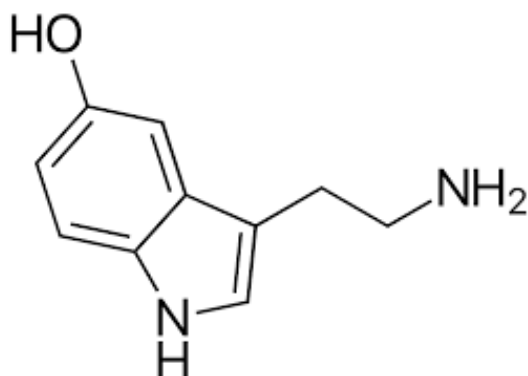


Figura 7. Estructura química de la serotonina

La serotonina se encuentra en vinos a niveles que van desde los 2000 ng/mL a los 23000 ng/mL (Mas et al., 2014a). Además, también está presente en otras bebidas fermentadas como la cerveza en concentraciones cd entre 3500 y 24200 ng/mL (Kirschbaum et al., 1999). También se ha detectado su presencia, a niveles bajos, en quesos a una concentración inferior a 4.10 mg/100 g (Vale & Glória, 1998).

La serotonina sigue la misma ruta metabólica que la melatonina. Este compuesto bioactivo es sintetizado a partir de su aminoácido precursor, el triptófano, en animales, plantas y levaduras (Figura 6).

1.2.4.2. Condiciones fermentativas para la producción de serotonina

Tabla 6. Condiciones fermentativas para la producción de serotonina

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de serotonina	Referencia
			Fructosa	Glucosa			
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> Aroma White	-	100 g/L	100 g/L	7 de 7 días	4.70 ± 0.63 ng/mL	Fernández-Cruz et al., 2016
					1 de 7 días	0.67 ± 0.31 ng/mL	
Vino Cabenet Sauvignon	-	-	220 g/L		Final maloláctica	3270 ± 280 ng/mL	Wang et al., 2014
						2940 ± 30 ng/mL	
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> P24	28	100 g/L	100 g/L	Inicio fase exponencial	7.03 ± 1.49 ng/10 ⁸ células (intracelular)	Fernández-Cruz et al., 2019
	<i>S. cerevisiae</i> QA23					1.50 ± 0.81 ng/10 ⁸ células (intracelular)	

Fernández-Cruz et al., (2016) observaron, que en el mosto sintético con la levadura *S. cerevisiae* Aroma White, las concentraciones de serotonina aumentaron progresivamente desde el primer día de fermentación hasta el último (día 7 de 7 días) que fue en el que se observó la mayor concentración (4.70 ± 0.63 ng/mL), no siendo cuantificada en el día 0. Por otro lado, la concentración menor (0.67 ± 0.31 ng/mL) con esta cepa de levadura apareció al inicio de la fermentación (día 1 de 7 días) (Fernández-Cruz et al., 2016) (Tabla 6).

A diferencia del mosto sintético, en el mosto de uva Cabernet Sauvignon, la concentración máxima (3.27 ± 0.28 mg/L) y mínima (2.94 ± 0.03 mg/L) de serotonina tuvieron lugar al final de la fermentación maloláctica, no siendo detectada en los diferentes estadios de la FA (días 0, 2, 3 y 7) (Wang et al., 2014). Estas concentraciones fueron 1000 veces superiores a las detectadas en el mosto sintético del estudio de Fernández-cruz et al., (2016).

La concentración más elevada de serotonina, en el medio intracelular en mosto sintético, tuvo lugar con la levadura *S. cerevisiae* P24 (7.03 ± 1.49 ng/ 10^8 células) en comparación con la levadura *S. cerevisiae* QA23 (1.50 ± 0.81 ng/ 10^8 células), demostrando que la serotonina también es un producto de la fermentación alcohólica, sintetizado por las levaduras. Además, no fue detectada con las levaduras *H. uvarum* Hu4 (CECT 13130) y *T. delbrueckii* Tdp (CECT 13135) (Fernández-Cruz et al., 2019). La máxima concentración (7.03 ± 1.49 ng/ 10^8 células) apareció al inicio de la fase exponencial, luego disminuyó a mitad de la fase exponencial, para volver a aumentar al final de esta fase y finalmente disminuyó finalizada la fermentación. La concentración más baja apareció también al inicio de la fase exponencial (1.50 ± 0.81 ng/ 10^8 células) (Fernandez-Cruz et al., 2019).

1.2.4.3. Propiedades bioactivas de la serotonina

La serotonina es de especial relevancia por su bioactividad en organismos superiores, incluidos los humanos (González et al., 2018). Concretamente, este compuesto posee notables propiedades antioxidantes. Se ha encontrado que produce puntuaciones altas en el ensayo de reducción de iones cúpricos (Cu^{2+}) (Gülçin, 2008) y en el test de capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), así como inhibiendo la peroxidación de lípidos en mitocondrias de hígado de rata (Sergeev et al., 1976). Este efecto bioactivo se observó en una concentración de 3.1-15 ng/mL (Mecoloni et al., 2012).

Existen datos que apoyan el papel estimulador de la serotonina en la proliferación de células tumorales *in vitro* (Dizeyi et al., 2004); (Siddiqui et al., 2006); (Cattaneo et al.,

1995); (Oufkir, et al., 2010); (Sonier et al., 2006); (Sol et al., 2010). Sin embargo, otros estudios confirman el papel inhibitorio (Sze et al., 1993); (Vicaut et al., 2000) de este compuesto en la proliferación de células tumorales destacando sus efectos antiangiogénicos y antiproliferativos en las células endoteliales y tumorales (Pakala et al., 1994); (Sze et al., 1993). Específicamente, la serotonina inhibe de manera significativa la activación del receptor VEGFR-2 inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular, en células endoteliales de la vena umbilical humana, y la posterior angiogenesis. Concretamente, la serotonina mostró un 24% de inhibición a 1 mM (Cerezo et al., 2017).

Asimismo, posee un efecto protector contra enfermedades neurodegenerativas y degenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Hornedo-Ortega et al., 2016). Específicamente, los niveles de melatonina y su precursor serotonina están significativamente disminuidos en personas mayores con Alzheimer y se asocian con la aparición del Alzheimer (Hornedo-Ortega et al., 2016); (Zhou et al., 2003). También dos estudios cuantitativos de casos de inicio muy temprano de Alzheimer mostraron niveles prácticamente indetectables de serotonina en múltiples ensayos de tejido cortical, límbico y subcortical (Ebinger et al., 1987). Respecto al Parkinson, Pasquini et al., (2018) muestran que el temblor en reposo (y por implicación el temblor 're-emergente') está más probablemente relacionado con la serotonina que con la deficiencia en dopamina (Pasquini et al., 2018).

Este compuesto también parece ejercer actividad antifúngica contra *Candida* y *Aspergillus spp.* in vitro. Concretamente, el rango de MIC (mínima concentración inhibitoria) contra la bacteria *Candida* fue 0.91–7.34 mM y el MFC (mínima concentración fungicida) fue de 1.83–14.68 mM, respectivamente (Lass-Flörl et al., 2003). En el caso del *Aspergillus spp.*, las concentraciones mínimas fungicidas fueron de 14.68 a 117.5 mM y de 29.37 a 235 mM durante 24 y 48 h de incubación (Lass-Flörl et al., 2002).

1.2.5. GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un tiol no proteico (Noctor et al., 2011), presente en varias formas en células, tejidos y plasmas aunque más del 90% del glutatión se encuentra en su forma reducida (Li et al., 2004).

El glutatión puede ser usado en aditivos de comida y en las industrias cosméticas (Li et al., 2004).

También actúa como refuerzo de la inmunidad y detoxificador (Penninckx, 2002); (Lu, 2009) en organismos eucariotas (Pastore et al., 2003); (Zechmann et al., 2011). Específicamente, en levaduras *S. cerevisiae*, juega un importante papel durante la detoxificación del cadmio (Mendoza-Cózatl et al., 2005).

Es sintetizado a partir del L-glutamato, de la L-cisteína y de la glicina por levaduras *S. cerevisiae* (Li et al., 2004); (Zechmann et al., 2011); (Lu, 2013); (Grant, 2001); (Mendoza-Cózatl et al., 2005); (Mendoza-Cózatl et al., 2005).

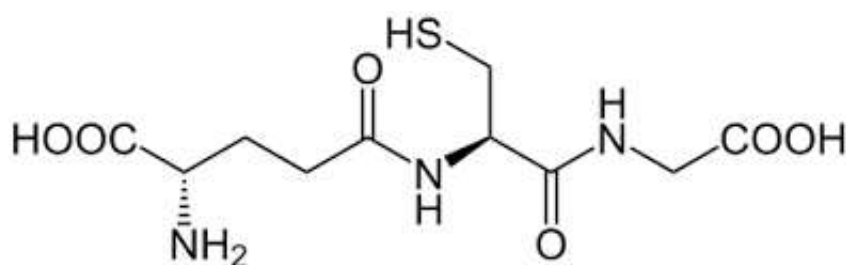


Figura 8. Estructura química del glutatión

Se ha estudiado la presencia de glutatión en bebidas fermentadas como el vino. Concretamente, las concentraciones encontradas rondan los 1320-21290 ng/mL (Martínez et al., 2019).

1.2.5.1. Ruta de síntesis

La biosíntesis de glutatión es similar en plantas, levaduras y protistas (Mendoza-Cózatl et al., 2005).

La biosíntesis de glutatión en *S. cerevisiae* tiene lugar en dos pasos dependientes de ATP (Zechmann et al., 2011):

1. La formación de la c-glutamilcisteína a partir del glutamato y de la cisteína por la c-glutamilcisteína sintetasa (codificada por GSH1) (Li et al., 2004); (Zechmann et al., 2011); (Lu, 2013); (Grant, 2001); (Mendoza-Cózatl et al., 2005) (Figura 9).

1ª reacción: L-glutamato + L-cisteína + ATP → γ -glutamil-L-cisteína + ADP + Pi (Lu, 2009)

2. La glicina es añadida a este producto intermediario, la c-glutamilcisteína, por la glutatión sintetasa (codificada por GSH2) para formar glutatión (Li et al., 2004);

(Zechmann et al., 2011); (Lu, 2013); (Grant, 2001); (Mendoza-Cózatl et al., 2005) (Figura 9).

2ª reacción: γ -glutamil-L-cisteína + L-glicina + ATP \rightarrow GSH + ADP + Pi (Lu, 2009)

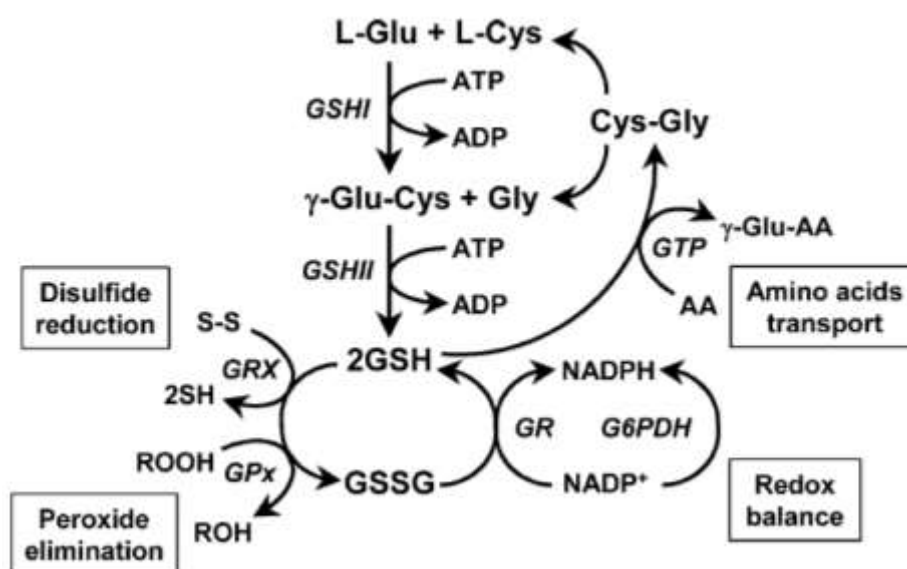


Figura 9. Ruta de síntesis del glutatión y sus funciones fisiológicas generales en microorganismos. Cys cisteína, Gly glicina, Glu glutamato, G6PDH glucoas-6-fosfato deshidrogenasa, GPx glutatión peroxidasa, GR glutatión reductasa, GRX glutarredoxina, GSHI γ -glutamilcisteína sintetasa, GSHII glutatión sintetasa, GTP γ -glutamilttransferasa, ROOH peróxidos, ROH peróxidos reducidos, S-S enlace disulfuro (Li et al., 2004)

1.2.5.2. Condiciones fermentativas para la producción de glutatión

Tabla 7. Condiciones fermentativas para la producción de glutatión

Muestra	Microorganismo	Tª (°C)	Azúcares	Tiempo	Concentración de glutatión	Referencia
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> BM45	28	200 g/L	-	16280 ± 1850 ng/mL	Guerrini et al., 2018
	<i>S. cerevisiae</i> P8				5390 ± 30 ng/mL	
Vino Trebbiano	Mo21T2-5	25	-	Final	5500 ng/mL	Mezzetti et al., 2014
	Mo21T2-10				≈ 2000 ng/mL	

El glutatión fue sintetizado por todas las cepas de levaduras analizadas en varios estudios: *S. cerevisiae* BM45 (16280 ± 1850 ng/mL), *S. cerevisiae* Zymaflore VL1 (10510 ± 760 ng/mL), *S. cerevisiae* R6 (7290 ± 480 ng/mL), *S. cerevisiae* Premium Zinfandel (6850 ± 480 ng/mL), *S. cerevisiae* EC1118 (5840 ± 450 ng/mL) y *S. cerevisiae* P8 (5390

± 30 ng/mL) (Guerrini et al., 2018) y Mo21T2-5 (5500 ng/mL), Mo21T2-12 (3750 ng/mL), *S. cerevisiae* 21T2 (≈ 2700 ng/mL) Mo21T2-1 (≈ 2600 ng/mL), Mo21T2-13 (≈ 2500 ng/mL), Mo21T2-7 (≈ 2100 ng/mL), Mo21T2-14 (≈ 2000 ng/mL), Mo21T2-8 (≈ 1900 ng/mL) y Mo21T2-10 (≈ 1500 ng/mL) (Mezzetti et al., 2014).

Según Guerrini et al., (2018), esta concentración máxima de 16280 ± 1850 ng/mL (Tabla 7) es cercana a 20 mg/L que es la dosis máxima permitida por la Resolución OIV-OENO 370-2012 para el tratamiento del mosto y del vino para limitar el fenómeno de la oxidación y proteger las sustancias aromáticas (OIV, 2015) ("Certified in conformity Mainz, 10," 2015).

El contenido de glutatión-reducido parece depender de las diferentes cantidades asimiladas o secretadas por varias cepas de levaduras *S. cerevisiae* involucradas en la FA (Kritzinger, 2012); (Mezzetti et al., 2014) sugiriendo que la cantidad presente después de la fermentación es cepa-dependiente (Guerrini et al., 2018). Sin embargo, se contradice con otro estudio en el que se observó un débil o un efecto no significativo de las levaduras *S. cerevisiae* sobre la concentración de GSH bajo condiciones de fabricación industrial del vino (Fracassetti, 2010).

1.2.5.3. Propiedades bioactivas del glutatión

Este compuesto es un importante antioxidante (Pastore et al., 2003); (Perrone et al., 2008); (Leal et al., 2018); (Guerrini et al., 2018); (Zechmann et al., 2011) para la protección del ADN, proteínas y otras biomoléculas (Li et al., 2004) contra el daño oxidativo generado (Chakravarthi et al., 2006); (Rahman et al., 2007); (Penninckx, 2002), por ejemplo, por especies reactivas de oxígeno (Li et al., 2004). El tratamiento de células con 1 mM de glutatión restableció la esperanza de vida media que se había visto reducida por una mutación (Heeren et al., 2004)

Además, el glutatión cobra importancia en la función inmune vía producción de glóbulos blancos y es uno de los más potentes agentes anti-virales conocidos (Li et al., 2004) pudiendo inhibir la infección causada por el virus de la gripe en cultivos de células de riñón canino de Madin-Darby y células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas. Específicamente, se vieron estos efectos con concentraciones superiores a 5 mM en el primer caso y de 10 a 30 mM en el segundo. GSH en el medio de cultivo inhibió significativamente la producción viral (Cai et al., 2003). Es considerada también una de las más poderosas, versátiles e importantes moléculas de defensa autogeneradas (Li et al., 2004).

En humanos, la deficiencia de glutatión se encuentra vinculada a infección por VIH, cirrosis de hígado, patologías pulmonares, inflamaciones gastrointestinales y pancreáticas, diabetes y enfermedades neurodegenerativas así como al envejecimiento (Wu et al., 2004). Es por ello que se usa como compuesto farmacéutico (Li et al., 2004) en el tratamiento de la cirrosis hepática en humanos, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento (Navarro et al., 1999).

1.2.6. GABA

GABA es el mayor neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central en animales (Erlander & Tobin, 1991); (Jakobs, et al., 1993); (Bown & Shelp, 1997); (Liu et al., 1998); (Komatsuzaki et al., 2005).

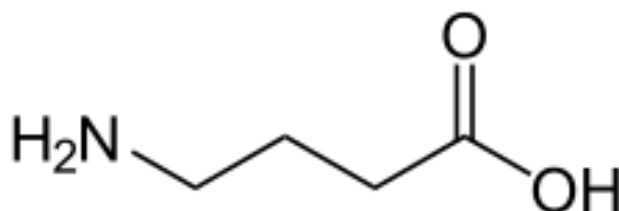


Figura 10. Estructura química del GABA

Asimismo, se considera que GABA tiene un papel principal como molécula señalizadora en los islotes pancreáticos ya que es considerada un factor paracrino (Gilon et al., 1991); (Reetz et al., 1991).

GABA está presente en alimentos fermentados y bebidas como el vino (710240 ng/mL) (Song et al., 2021), el kimchi (61650000 ng/100 g) (Cho et al., 2011), el tempeh (1740000000 ng/100 g base seca) (Aoki et al., 2003), la leche fermentada (8300000 ± 600000 ng/mL) (Han et al., 2020), la leche de soja negra (2450000 ± 30000 ng/mL) (Ko et al., 2013), el yogur (2000000 ng/mL) (Linares et al., 2016), el pan de masa madre (504000000 ng/kg) (Coda et al., 2010) y la cerveza de mora (2420000 ng/mL) (Zhang et al., 2020).

1.2.6.1. Ruta de síntesis

El GABA se sintetiza a partir del glutamato. Esta conversión de glutamato a GABA es catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Yogeswara et al., 2020). Esta reacción requiere de piridoxal-5-fosfato (PLP) como cofactor (Yogeswara et al., 2020) (Figura 11).

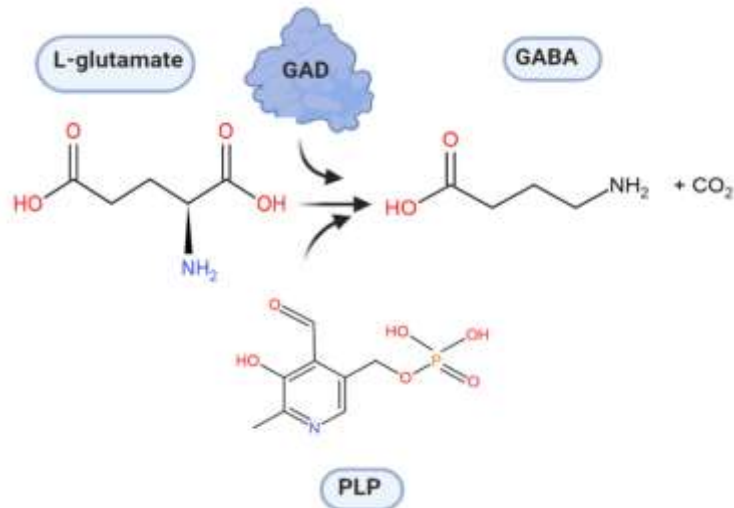


Figura 11. Reacción de formación del GABA. PLP: piridoxal-5'-fosfato (Yogeswara et al., 2020)

Esta ruta metabólica, llamada GABA shunt o vía GAD/GABA, se conserva de bacterias, a través de levaduras y plantas, a vertebrados (Bach et al., 2009). Consiste en dos pasos del ciclo del ácido tricarboxílico: el α -cetoglutarato (α -KG) complejo deshidrogenasa y la succinil coenzima A (CoA) sintasa: para la conversión del α -KG en succinato (Figura 11). Intervienen en tres enzimas: la glutamato descarboxilasa que cataliza la descarboxilación de glutamato a GABA, la GABA transaminasa que convierte el GABA en succinato semialdehído (SSA) y la SSA deshidrogenasa que cataliza la oxidación de SSA a succinato (Bach et al., 2009).

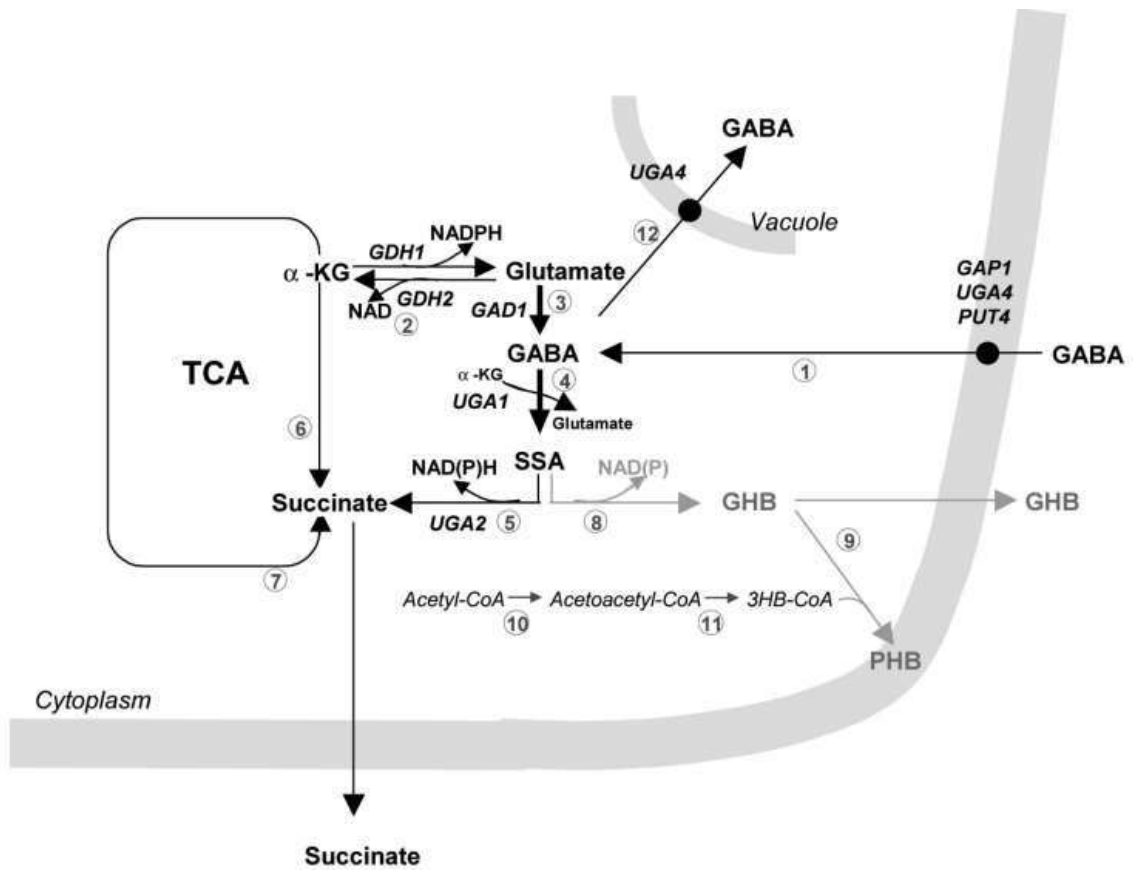


Figura 12. Captación y catabolismo de GABA en función del metabolismo del carbono central de la levadura (Bach et al., 2009)

1.2.6.2. Condiciones fermentativas para la producción de GABA

Tabla 8. Condiciones fermentativas para la producción de GABA

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares	Tiempo	Concentración de GABA	Referencia
Kimchi	<i>L. sakei</i>	-	-	35 de 120 días	1856.16 ng/mL	Jeong et al., 2013
				0-5 de 120 días	≈ 0 ng/mL	
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	30	-	3 días	61650000 ng/100 g	Cho et al., 2011
Mosto de uva Cabernet Sauvignon fermentado	-	-	220 g/L	0 de 7 días	96230 ± 5330 ng/mL	Wang et al., 2014
					89620 ± 3380 ng/mL	
Vino	-	28-30	-	5 días	710240 ng/mL	Song et al., 2021
Tempeh	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>Oligosporus</i> IFO 32002	-	-	-	1740000000 ng/100 g base seca	Aoki et al., 2003
	<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 5780				420000000 ng/100 g base seca	
Leche fermentada	<i>Streptococcus thermophiles</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	-	48 h	8300000 ± 600000 ng/mL	Han et al., 2020
	<i>S. thermophilus</i>	-			2300000 ± 200000 ng/mL	
Leche de soja negra	<i>Lactobacillus brevis</i> FPA 3709	37	-		2450000 ± 30000 ng/mL	Ko et al., 2013
	<i>Lactobacillus Brevis</i> FPS 2520				≈ 900000 ng/mL	
Yogur	<i>Streptococcus thermophilus</i>	42	4.8–5.8%		2000000 ng/mL	Linares et al., 2016
Pan de masa madre	<i>Lactobacillus plantarum</i> C48	-	-	-	504000000 ng/kg	Coda et al., 2010
Cerveza de mora	<i>L. plantarum</i> BC114 y <i>S. cerevisiae</i> SC125	30	-	72 h de 72 h	2420000 ng/mL	Zhang et al., 2020
				36 h de 72 h	450000 ng/mL	

Lactobacillus sakei fue la única bacteria ácido láctica productora de GABA en el kimchi en comparación con las bacterias ácido lácticas *Leuconostoc gasicomitatum*, *Weissella koreensis*, y *Leuconostoc gelidum* (Jeong et al., 2013). El kimchi es un alimento vegetal fermentado tradicional de Corea, que tiene como ingrediente principal la col asiática (*Brassica pekinensis*) (Cheigh HS & Park KY, 1994). La máxima producción de GABA fue de 1856.16 ng/mL (Jeong et al., 2013) (Tabla 8).

En el tempeh, el hongo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* IFO 32002 fue el mayor productor en comparación con los hongos *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* IFO 32003 (1500000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* IFO

31987 (810000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus oryzae* IFO 4705 (770000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus oryzae* IFO 5438 (770000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus microsporus var. oligosporus* IFO 8631 (720000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus oryzae* IFO 9364 (629000000 ng/100 g base seca), *Rhizopus oryzae* IFO 4770 (510000000 ng/100 g base seca) y *Rhizopus oryzae* IFO 5780 (420000000 ng/100 g base seca) (Aoki et al., 2003).

En la leche de soja negra, la bacteria *Lactobacillus brevis* FPA 3709 produjo la mayor concentración de GABA (2450000 ± 30000 ng/mL) en comparación con las bacterias *Lactobacillus Brevis* FKR 3739 (≈ 2150000 ng/mL), FPP 3713 (≈ 1800000 ng/mL), FKR 3741 (≈ 1700000 ng/mL), FKR 3737 (≈ 1350000 ng/mL), FPA 3708 (≈ 1250000 ng/mL), FPAW 3778 (≈ 1250000 ng/mL), FKR 2526 (≈ 1200000 ng/mL), FPM 3702 (≈ 950000 ng/mL) y FPS 2520 (≈ 900000 ng/mL) (Ko et al., 2013).

En la cerveza de mora, un cocultivo de *L. plantarum* BC114 y *S. cerevisiae* SC125 dio lugar a la mayor concentración de GABA (2420000 ng/mL) en comparación con solo *L. plantarum* BC114 (1450000 ng/mL) y con solo la cepa de levadura *S. cerevisiae* SC125 (1030000 ng/mL) (Zhang et al., 2020).

En la leche fermentada, un cocultivo de *S. thermophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* produjo la mayor concentración de GABA (8300000 ± 600000 ng/mL) en comparación con un cocultivo de *S. thermophilus* y *Lactobacillus paracasei* (6200000 ± 400000 ng/mL), un cocultivo de *S. thermophilus* y *Lactobacillus helveticus* (5200000 ± 400000 ng/mL), un cocultivo de *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* (2500000 ± 200000 ng/mL) y *S. thermophilus* (2300000 ± 200000 ng/mL) (Han et al., 2020).

En el estudio de Zhang et al., (2020) las concentraciones de GABA, en la cerveza de mora, aumentarían progresivamente hasta alcanzar la máxima concentración (2420000 ng/mL) al final de la fermentación (72 horas de 72 horas). Por otro lado, la menor concentración (450000 ng/mL) apareció a mitad de la fermentación (36 h de 72 h).

En el estudio de Jeong et al., (2013) la concentración de GABA, en el kimchi, aumentó de forma continua, hasta alcanzar su máxima concentración (1856.16 ng/mL) al inicio de la fermentación (aproximadamente día 35 de una fermentación de 120 días) y a partir de este punto disminuyó levemente hasta mantenerse casi constante hasta el final de la fermentación.

En los mostos de uva Cabernet Sauvignon la concentración máxima (96230 ± 5330 ng/mL) apareció también al inicio de la fermentación (día 0 de 7 días). A partir de esa

máxima concentración (96230 ± 5330 ng/mL) el GABA no fue detectado en las etapas siguientes de la FA (días 2, 4 y 7) (Wang et al., 2014).

Según Han et al., (2020), la temperatura afectó a la producción de GABA siendo mayor a 42°C (1300000 ± 100000 ng/mL) que a 37°C (1100000 ± 100000 ng/mL) durante una fermentación de 24 horas debido a la rápida tasa de crecimiento a una temperatura alta, pero disminuyó durante períodos más largos (48 o 72 horas) debido a la muerte bacteriana más rápida a la mayor temperatura.

1.2.6.3. Propiedades bioactivas del GABA

El GABA posee actividades ansiolíticas, antidepresivas y antihipertensivas, regula la secreción hormonal (Ogunleye et al., 2015); (Yoshimura et al., 2010); (Inoue et al., 2003); (Tsai et al., 2006); (Lee & Paik, 2017) ya que, por ejemplo, inhibe la secreción de prolactina en la pituitaria anterior en ratas (Racagni et al., 1979). También reduce la presión sanguínea en animales experimentales así como en humanos (Inoue et al., 2003); (Kimura et al., 2002). El consumo diario de 10 mL de leche fermentada con contenido en GABA durante 12 semanas es suficiente para mostrar efectos en personas con hipertensión leve (Inoue et al., 2003). En el estudio de Kimura et al., (2002), se produjeron disminuciones de la presión arterial relacionadas con la dosis entre 0.3 y 300 mg/kg de GABA intraduodenal. En el suero de leche en polvo de una leche de soja fermentada, con un 0.36 % de GABA, se inhibió la enzima convertidora de angiotensina I in vitro (Tsai et al., 2006).

Este compuesto puede estar involucrado en la respuesta al estrés, por ejemplo, hipoxia, estrés mecánico, choque por frío, choque por calor y estrés hídrico (Wallace et al., 1984); (Mayer et al., 1990); (Rhodes et al., 1986) así como en el desarrollo y diferenciación de las células (Behar et al., 1996); (Barbin et al., 1993); (LoTurco et al., 1995); (Liu et al., 1997). GABA produjo efectos dependientes de la concentración y saturables en la entrada de Cl^- en células del tronco encefálico (cultivos de células disociadas primarias) en el día 3 in vitro, con una mejora máxima a 10 mM GABA a 13.6 nmol/mg de proteína (Liu et al., 1997).

Además, extractos de arroz integral con niveles mejorados de GABA tuvieron acciones inhibitorias en la proliferación de células en la leucemia y efectos estimulantes sobre la apoptosis de células cancerosas. Concetramente, el extracto de arroz integral con GABA (820 nmol/mL) retrasó significativamente las tasas de proliferación de células

L1210 y Molt4 y mejoró significativamente la apoptosis de los cultivos de células L1210 (Oh & Oh, 2004).

1.2.7. TIROSOL

El tirosol, 2-(4-hidroxifenil)etanol, es también un alcohol superior producido por el catabolismo de la tirosina durante la fermentación alcohólica por las levaduras a través de la vía de Ehrlich (Mas et al., 2014). Regula la morfogénesis durante la falta de nitrógeno y actúa como molécula QS en las levaduras *S. cerevisiae* (Avbelj et al., 2016); (Wuster & Babu, 2009).

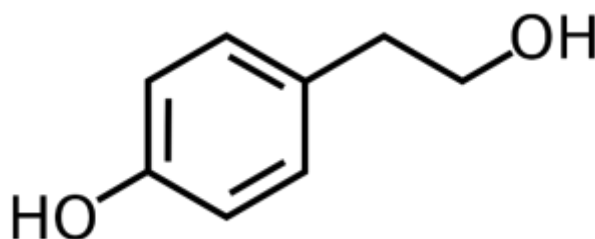


Figura 13. Estructura química del tirosol

Las bebidas fermentadas como el vino y la cerveza contienen tirosol. Los vinos tintos presentan concentraciones superiores que los blancos. Concretamente, en los primeros se encuentran entre 3610 ng/mL y 73100 ng/mL mientras que en los segundos rondan entre los 1100 ng/mL y los 45000 ng/mL (Tabla 9). Por otro lado, las concentraciones presentes en la cerveza se encuentran entre los 9700 ng/mL y los 11450 ng/mL (Soldevila-Domenech et al., 2019); (Boronat et al., 2020).

Tabla 9. Concentraciones de tirosol en vinos tintos y blancos

Tipo de vino	Variedad	Concentración de tirosol (ng/mL)	Referencia
Tintos	Montepulciano	5900	Minussi et al., 2003
	Barbera	5900	
	Blended	6000	
	Nero d'Avola	30000	De la Torre et al., 2006
	Merlot	33000	
	Cabernet, Syrah, Petit-Verdot	44700	
	Blend	-	Ragusa et al., 2017
	Negroamaro	-	
	Primitivo	-	
	Susumaniello	-	
	Tempranillo	24980	
	Petit Verdot	39540	Piñeiro et al., 2011
	Syrah	37540	
	Blasco	27380	
	Cabernet Sauvignon	32260	
	Merlot	44460	
	Tintilla de Rota	29940	
	Melonera	36090	
	<i>Vitis silvestris</i>	29100	
	Palomino negro	29570	
	Rome	35490	
	Garnacha	28440	
	Lemberger	39700	Pour Nikfardjam & Pickering, 2008
	Kadarka	50400	
	Baco Noir	73100	
	Maréchal Foch	63900	
	Villa Adami	4690	
Chianti Classico	3610	Di Tommaso et al., 1998	
Collesecco Rubino	3680		
Barbera del Monferrato	4470		
Piave Merlot	4800		
Trebbiano d'Abruzzo	2340		
Galestro Ruffino	1710		
Bolla Soaveb	1690		
Grigio Di Ca'Vit	1570		
Corvo	1420	Ragusa et al., 2017	
Bianco d'Alessano	-		
Blend	-		
Chardonnay	-		
Falanghina	-		
Fiano	-		
Malvasia	-		
Moscato	-		
Negroamaro	-		
Verdecca	-		
Greco di Tufo	1100	Minussi et al., 2003	
Pinot Grigio	1700		
Verdicchio	2400		
Blancos			

1.2.7.1. Ruta de síntesis

Los alcoholes superiores son formados durante la fermentación a partir de los ceto ácidos. Estos ceto ácidos son producidos a través de la ruta catabólica (Hazelwood et al., 2008) o de la ruta anabólica (Hammond 1993). La primera implica la degradación de los amino ácidos presentes en la fermentación a través de la ruta de Ehrlich (Hazelwood et al., 2008) mientras que la segunda es la ruta de biosíntesis de los aminoácidos a partir de la fuente de carbono (Hammond 1993). Las levaduras siguen la ruta de Ehrlich cuando usan otras fuentes como los aminoácidos, en el caso de que su fuente de nitrógeno preferida, el amonio esté restringida (Mas et al., 2014).

El tirosol y el HT podrían ser considerados como metabolitos secundarios formados por las levaduras durante la FA a partir del aminoácido tirosina (Dickinson et al., 2003).

En este caso la ruta de Ehrlich a partir de la tirosina consiste en las siguientes reacciones (Figura 14):

1. Transaminación de la tirosina: transaminación del grupo amino y la formación, a partir de la tirosina, del α -ceto ácido correspondiente, el 4-hidroxifenil piruvato (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b). Esta reacción es catalizada por la aminotransferasa aromática I la cual es codificada por el gen ARO8 (Chrzanowski, 2020).
2. Descarboxilación del 4-hidroxifenilpiruvato: este ceto ácido es descarboxilado, por la piruvato descarboxilasa, a su correspondiente aldehído, el 4-hidroxifenilacetaldehído (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b). Esta reacción es catalizada por la descarboxilasa aromática codificada por el gen ARO10 y por la piruvato descarboxilasa (Avbelj et al., 2015).
3. Reducción del 4-hidroxifenilacetaldehído: dependiendo del estado de oxidación-reducción de la célula, este aldehído puede ser metabolizado, por la alcohol deshidrogenasa, al alcohol aromático correspondiente, el tirosol, o ser oxidado a su correspondientes ácido, el ácido 4-hidroxifenilacético (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b).

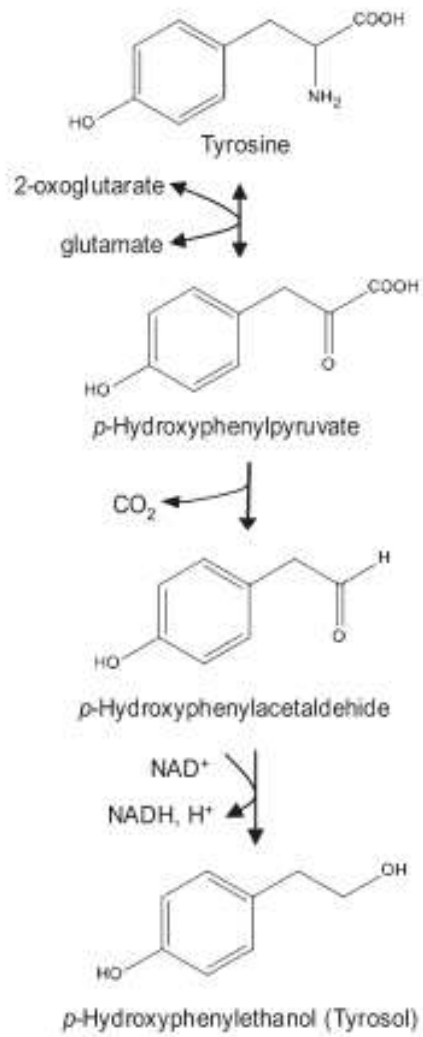


Figura 14. Ruta de síntesis del tirosol en vinos por el metabolismo de la levadura (Piñeiro et al., 2011)

1.2.7.2. Condiciones fermentativas para la producción de tirosol

Tabla 10. Condiciones fermentativas para la producción de tirosol

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de tirosol	Referencia
			Fructosa	Glucosa			
Mosto sintético fermentado x5 aminoácidos aromáticos	<i>H. uvarum</i> Hu4 y <i>S. cerevisiae</i> QA23	28	100 g/L	100 g/L	48 h de 2 días	≈ 13816.4 ng/mL	González et al., 2018
	<i>S. bacillaris</i> Cz4					≈ 2763.28 ng/mL	
Mosto sintético fermentado	<i>S. cerevisiae</i> EC1118	22	100 g/L	100 g/L	29 h de 29 h	≈ 6908.02 ng/mL	Zupan et al., 2013
	<i>T. pretoriensis</i>				28 h de 28 h	≈ 967.148 ng/mL	
	<i>S. cerevisiae</i> BM45	28	200 g/L	Final	7100 ± 110 ng/mL	Guerrini et al., 2018	
	<i>S. cerevisiae</i> Premium Zinfandel				4060 ± 150 ng/mL		
Vino Tannat	<i>S. cerevisiae</i> Natuferm 804	23- 26	240 g/L	Maceración fría prefermentativa	37850 ± 5020 ng/mL	Favre et al., 2014	
				Maceración tradicional	26320 ± 3880 ng/mL		
Vino Monastrell suplementado en Hys	<i>S. cerevisiae</i> U.C.L.M. S325	22	-	-	Final (30 días)	≈ 60000 ng/mL	Bordiga et al., 2016
		16				≈ 20000 ng/mL	
Vino Piave Merlot	-	-	-	-	-	4800 ± 310 ng/mL	Di Tommaso et al., 1998
Vino Corvo	-	-	-	-	-	1420 ± 30 ng/mL	
Vino Merlot	-	-	-	-	-	44460 ± 2130 ng/mL	Piñeiro et al., 2011
Vitis silvestris D	-	-	-	-	-	20380 ± 1910 ng/mL	
Mosto sintético fermentado x5 aminoácidos aromáticos	<i>H. uvarum</i> Hu4 y <i>S. cerevisiae</i> QA23	28	100 g/L	100 g/L	48 h de 2 días	≈ 34541 ng/mL (intracelular)	González et al., 2018
	<i>S. bacillaris</i> Cz4					≈ 6908.2 ng/mL (intracelular)	

El mosto sintético estándar suplementado 5 veces en aminoácidos aromáticos (50 mg/L de tirosina, triptófano y fenilalanina) dio lugar a una mayor concentración de tirosol cuando se comparó con un mosto estándar, un mosto limitado en nitrógeno (300 mg/L) y un mosto bajo en glucosa (20 g/L de glucosa y 0 g/L de fructosa) (González et al., 2018). Los resultados de González et al., (2018) demuestran que un aumento de tirosina (7-98 mg/L) conduce a una mayor producción de su alcohol resultante, el tirosol (0-34541 ng/mL aprox). Otros estudios también observaron que el incremento de tirosina (50 mg/L) produjo un aumento general en la producción de tirosol (≈ 14000 µg/g peso seco) (Ghosh et al., 2008); (Gori et al., 2011). Sin embargo, estos autores observaron que estos incrementos en los alcoholes no eran

proporcionales a los aumentos en los precursores. Concretamente Gori et al., (2011) mostraron que, aunque la suplementación de tirosina fue de 50 µg /mL (junto con la fenilalanina y el triptófano), la producción de tirosol aumentó entre 16 y 79 veces.

El tirosol fue sintetizado por la mayoría de las cepas de levaduras analizadas en diversos estudios: *H. uvarum* Hu4 (≈ 13816.4 ng/mL), *S. cerevisiae* QA23 (≈ 13816.4 ng/mL), *T. delbrueckii* Tdp (≈ 11053.12 ng/mL), *M. pulcherrima* Mpp (≈ 5526.56 ng/mL) y *S. bacillaris* Cz4 (≈ 2763.28 ng/mL) (González et al., 2018); *S. cerevisiae* BM45 (7100 ± 110 ng/mL), *S. cerevisiae* R6 (6170 ± 180 ng/mL), *S. cerevisiae* P8 (4970 ± 250 ng/mL), *S. cerevisiae* Zymaflore VL1 (4630 ± 0.00 ng/mL), *S. cerevisiae* EC1118 (4110 ± 70 ng/mL) y *S. cerevisiae* Premium Zinfandel (4060 ± 150 ng/mL) (Guerrini et al., 2018) y *S. cerevisiae* EC1118 (≈ 6908.02 ng/mL), ZIM 850 *Z. baili* (≈ 2763.28 ng/mL), ZIM 670 *H. uvarum* (≈ 1943.3 ng/mL) y ZIM 734 *T. pretoriensis* (≈ 967.148 ng/mL) (Zupan et al., 2013) (Tabla 10).

Por el contrario, Zupan et al., (2013) encontraron que las levaduras ZIM 842 *C. zemplinina* y ZIM 701 *D. bruxellensis* no sintetizaron tirosol.

Gerrini et al., (2018) observaron que la cantidad final de tirosol encontrada en los vinos mostraron una correlación positiva con el tipo de levadura ($R^2 = 0.97$, $p < 0.05$), indicando un comportamiento cepa-dependiente en la producción de este alcohol superior. Concretamente, las levaduras no- *Saccharomyces* con frecuencia forman bajos niveles de alcoholes superiores en comparación con las *S. cerevisiae* (González et al., 2018). Sin embargo, hay una gran variabilidad entre las cepas (Romano et al., 1992); (Zironi et al., 1993).

González et al., (2018) sostienen que la mayor síntesis de estos alcoholes en *S. cerevisiae* puede ocurrir porque las especies no *S. cerevisiae* (*C. stellata*, *C. zemplinina* y *S. bombicola*) difieren de las *S. cerevisiae* en la distribución del flujo metabólico durante la fermentación y, por lo tanto, en la producción de etanol, en la síntesis de biomasa y en la formación de subproductos (Ciani et al., 2000); (Magyar & Tóth, 2011); (Milanovic et al., 2012); (Tofalo et al., 2012).

En los estudios de González et al., (2018) y Zupan et al., (2013) las concentraciones de este compuesto, en mosto sintético, aumentaron a medida que fue avanzando la fermentación hasta alcanzar sus máximas concentraciones (≈ 13816.4 ng/mL y ≈ 6908.02 ng/mL) al final (48 horas de 2 días y 29 h de 29 h).

Al igual que en el mosto sintético, en el mosto de uva Monastrell fermentado con *S. cerevisiae* U.C.L.M. S325 a 22°C y suplementado con histidina (50 mg/L) las concentraciones máximas (≈ 60000 ng/mL) se obtuvieron también al final de la FA (Bordiga et al., 2016). Sin embargo, cuando se fermentó el mismo mosto suplementado con histidina, tirosina y triptófano (50, 25 y 10 mg/L, respectivamente) a 16°C la mayor concentración se obtuvo a mitad de la fermentación (≈ 38000 ng/mL), disminuyendo posteriormente (≈ 29000 ng/mL) (Bordiga et al., 2016).

Cuando se comparó la maceración fría prefermentativa (antes de la FA) con la maceración tradicional (simultánea a la FA), Favre et al., (2014) demostraron que la actividad de las cepas de levaduras nativas en la fase prefermentativa fue posiblemente la responsable de que las concentraciones obtenidas de tirosol fueran significativamente superiores (37850 ± 5020 ng/mL) en la primera con respecto a la segunda. En vinos tintos Tanat, la mayor concentración (37850 ± 5020 ng/mL) apareció antes de la FA, en una maceración fría prefermentativa (antes de la maceración tradicional) en comparación con la maceración tradicional (simultánea a la FA), la vinificación con adición de enzimas pectolíticas en el “barreling” y la adición de taninos de las semillas de las uvas en el “barreling”. Por otro lado, la menor concentración de este compuesto (26320 ± 3880 ng/mL) apareció en la maceración tradicional (Favre et al., 2014). Feuillat (1997) demostró un aumento en la diversidad de levaduras en los primeros pasos de la maceración fría prefermentativa. Favre et al., (2014) justifican que este aumento en la diversidad de levaduras en los primeros pasos de la maceración fría prefermentativa (Feuillat, 1997), podría explicar la aparición de la concentración más elevada de tirosol.

En el estudio de González et al., (2018) la concentración de este compuesto, en el medio intracelular, en mosto sintético, aumentó a medida que fue avanzando la fermentación hasta alcanzar su máxima concentración (≈ 34541 ng/mL) al final de la fermentación (48 h de 2 días) (González et al., 2018).

La producción de tirosol depende de la variedad de vino estudiada. En concreto, en el vino tinto Piave Merlot, fue en el que presentó la mayor concentración (4800 ± 310 ng/mL) en comparación con los vinos tintos Villa Adami (4690 ± 250 ng/mL), Chianti Classico (3610 ± 130 ng/mL), Collesecco Rubino (3680 ± 260 ng/mL), Barbera Del Monferrato (4470 ± 90 ng/mL) y los vinos blancos Trebbiano d'Abruzzo (2340 ± 340 ng/mL), Galestro Ruffino (1710 ± 110 ng/mL), Bolla Soave (1690 ± 50 ng/mL), Grigio Di Ca'Vit (1570 ± 80 ng/mL). Por otro lado, el vino en el que apareció la menor concentración (1420 ± 30 ng/mL) fue el Corvo (Di Tommaso et al., 1998).

Por otra parte, en el estudio de Piñeiro et al., (2011), el vino en el que apareció la concentración más elevada de tirosol fue en la variedad Merlot (44460 ± 2130 ng/mL) en comparación con los vinos Tempranillo, Blasco, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot, Syrah, Tintilla de Rota, Melonera, Tempranillo, *Vitis silvestris*, Palomino Negro, Rome y Garnacha. Por otro lado, la menor concentración (20380 ± 1910 ng/mL) apareció en el vino procedente de variedades de la especie *Vitis silvestris* (Piñeiro et al., 2011a).

Otros factores que han demostrado influir en la producción de tirosol son: el pH, el sulfato de amonio, el cloruro sódico (Gori et al., 2011), la agitación (Zupan et al., 2013), la densidad celular de los cultivos (Gori et al., 2011); (González et al., 2018), la temperatura de fermentación (Bordiga et al., 2016), el grado de alcohol de los vinos (Bordiga et al., 2011) y la concentración de glucosa de los mostos (González et al., 2018).

Según Gori et al, (2011) aunque las concentraciones de tirosol detectadas para la levadura *D. hansenii* fueron inferiores a aquellas detectadas por la levadura *S. cerevisiae*, la producción de este compuesto estuvo fuertemente influenciada por diferentes condiciones medioambientales para las tres cepas de levaduras *D. hansenii*. Estas condiciones fueron el pH, el sulfato de amonio y el cloruro sódico (Gori et al., 2011).

Gori et al., (2011) declararon que las tres cepas *D. hansenii* (CBS767, D18335 y MD02) parecieron producir el mayor rendimiento de este alcohol aromático a pH 6, no siendo detectado con un pH >8 (Gori et al., 2011).

La adición de sulfato de amonio (50–37 000 mM) disminuyó la producción de tirosol (Gori et al., 2011). No obstante, la presencia de un 2% (v/v) de NaCl aumentó la producción de tirosol 6.2 veces en la cepa *D. hansenii* D18335 mientras que el aumento de NaCl disminuyó la producción en las cepas *D. hansenii* CBS767 y MD02 (Gori et al., 2011).

Zupan et al., (2013) demostraron una agitación débil y un efecto Crabtree reprimieron el metabolismo aeróbico y favoreció la fermentación siendo la producción de tirosol ligeramente superior. Estos autores explicaron que las proporciones entre la producción de etanol y el consumo de glucosa/fructosa confirman esta hipótesis.

Gori et al., (2018) muestran que la producción de tirosol (138.16-276.33 ng/mL) fue ante todo determinada desde el final de la fase exponencial indicando una conexión con la densidad celular. Además, declaran que cultivos con una alta densidad celular parecieron producir unas concentraciones superiores de alcoholes moléculas QS en

comparación con cultivos con una baja densidad celular. Opinan que eso sugiere que el alcohol aromático, tirosol, es una potencial molécula QS en la levadura *D.hansenii* como se encontró previamente para *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006).

Bordiga et al., (2016) mantienen que el factor temperatura afectó a todos los pasos del muestreo de manera significativa. Específicamente, el mosto que resultó en una mayor concentración de tirosol (≈ 60000 ng/mL) fue fermentado a 22°C mientras que el que dio lugar a una menor concentración (≈ 20000 ng/mL) se fermentó a 16°C (Bordiga et al., 2016). Sin embargo, Gori et al., (2011) observaron que el cambio de temperatura de 25°C a 15°C no influyó significativamente en la producción de tirosol.

Bordiga et al., (2016) también manifiestan que el factor grado de alcohol afectó de manera significativa a todos los pasos del muestreo. Concretamente, el vino que dio lugar a una mayor concentración de tirosol tenía un grado de alcohol normal (12°C) mientras que el que dio a la menor concentración poseía una graduación alcohólica ligeramente superior de 15°C (Bordiga et al., 2016).

De acuerdo con González et al., (2018), igual que ocurre en el caso del triptofol, la limitación en glucosa generalmente inhibe la producción de alcoholes aromáticos por lo que en el mosto sintético bajo en glucosa (20 g/L de glucosa y 0 g/L de fructosa) (suplementado 5 veces en aminoácidos aromáticos: 50 µg/mL de tiramina, triptófano y fenilalanina) después de 5 días de fermentación, las concentraciones de tirosol fueron desde cercanas a 0 ng/mL a aproximadamente 2072.46 ng/mL con la levadura *H. uvarum* Hu4 (González et al., 2018). Estos autores justifican esta baja producción de tirosol en el mosto bajo en glucosa, al igual que ocurría en el caso del triptofol, con, tal como se explica en el apartado 1.2.1.2. Las razones son la baja densidad celular, el rápido agotamiento de la glucosa y el metabolismo respiro-fermentativo (González et al., 2018).

1.2.7.3. Propiedades bioactivas del tirosol

Los alcoholes aromáticos, como el tirosol, pueden actuar como antimicrobianos (Gañan et al., 2009); (Cueva et al., 2012). Los valores de tirosol estudiados frente a diferentes cepas de bacterias son los siguientes: 15.9 µg/mL frente a *Moraxella Catarrhalis* y 1008 µg /mL frente a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Cueva et al., 2012). En concreto, el tirosol ha demostrado tener propiedades antimicrobianas frente a varias cepas de bacterias (*Helicobacter pylori*, *Eschericia. coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides sp*, *Streptococcus mutans*, *Staphocioccus aureus*, *Lysteria monocytogenes*, *Yersinia sp*, *Salmonella entérica*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella Sonnei* y *C.*

albicans) responsables de infecciones intestinales y respiratorias, *in vitro* (Cicerale et al., 2012).

Además, este compuesto se caracteriza por ser un importante agente antioxidante (Fernández-Mar et al., 2012); (Tuck & Hayball, 2002); (Bertelli et al., 2002), con un fuerte efecto protector contra el daño oxidativo en numerosos sistemas celulares (Di Benedetto et al., 2007). Sus propiedades antioxidantes son tales como la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Di Benedetto et al., 2007) y la neutralización de radicales libres como el NOO^\cdot y O_2^\cdot (Covas et al., 2003). Específicamente, se ha demostrado que el tirosol protege a las células Caco-2 frente al daño celular oxidativo inducido por las LDL oxidadas y la exposición de estas células al tirosol previene la retracción celular causada por las LDL oxidadas (Giovannini et al., 1999). Unas concentraciones de 0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L y 1 mmol/L de tirosol, en células Caco-2 (línea celular de adenocarcinoma de colon humano), revertieron la actividad antiproliferativa de las LDL oxidadas (Giovannini et al., 1999). Vivancos & Moreno (2008) recientemente informaron de que el tratamiento con n-tirosol redujo el estrés oxidativo estimulado por las LDL oxidadas en macrófagos RAW 264.7 (Vivancos & Moreno, 2008). En concreto, 100 mM de tirosol disminuyeron notablemente los niveles de H_2O_2 inducidos por las LDL oxidadas e inhibieron significativamente la liberación de $[\text{}^3\text{H}]$ ácido araquidónico y la síntesis de PGE2 (Vivancos & Moreno, 2008). El ácido araquidónico es precursor de la síntesis de prostaglandinas como la PGE2 (Straus & Glass, 2001) y la PGE2 es un importante mediador lipídico en las respuestas inflamatorias e inmunitarias durante las infecciones agudas y crónicas (Phipps et al., 1991); (Yu & Chadee, 1998); (Harris et al., 2002); (Nagamatsu & Schust, 2010).

Respecto a sus propiedades cardioprotectoras, induce protección del miocardio frente al estrés ocasionado por la isquemia, reduciendo significativamente (32%) el tamaño del infarto de miocardio y mejorando las funciones miocárdicas del ventrículo izquierdo. Esta protección del miocardio ha impulsado el desarrollo de un fármaco nuevo para combatir la cardiopatía isquémica (Samson Mathews et al., 2008).

Con referencia a sus propiedades antiinflamatorias, Giovannini et al., (2001) informaron de que el tirosol podría inhibir las reacciones inflamatorias inhibiendo la liberación del factor TNF-alfa inducida por 6 LPS. Además, el tirosol podría también prevenir la inflamación inhibiendo la expresión génica de iNOS y COX-2 en macrófagos. El tratamiento de células RAW 264.7 (línea celular de monocitos/macrófagos de ratón) con 1, 2 y 4 mM de tirosol inhibió significativamente y en forma de concentración el aumento

de nitrito. También, 2 mM de tirosol inhibió significativamente el aumento de iNOS (De Stefano et al., 2007).

Es un compuesto de interés farmacéutico que muestra varias actividades de mejora de la salud derivadas de sus propiedades de neutralizador de radicales libres, cardioprotectoras (Tuck & Hayball, 2002); (Covas et al., 2003); (Kris-Etherton et al., 2002); (Di Benedetto et al., 2007); (Samson Mathews et al., 2008), antiinflamatorias (Bertelli et al., 2002) y neuroprotectoras (St-Laurent-Thibault et al., 2011). Además, previene la osteopenia. Específicamente, cuando el tirosol se administró como fenol simple a la concentración de 10 mg/kg de peso corporal/día, fue capaz de prevenir la inflamación inducida osteopenia en ratas ovariectomizadas (Puel et al., 2008).

1.2.8. HIDROXITIRO SOL

El HT 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol es un fenilalcohol conocido por ser un potente bioactivo (Cornwell & Ma, 2008); (Tripoli et al., 2005).

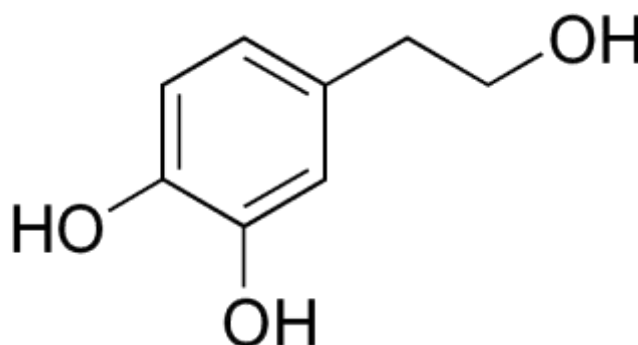


Figura 15. Estructura química del hidroxitirosol

El HT es uno de los principales fenoles de la aceituna y el aceite de oliva (Moreno-González, et al., 2020); (García-Villalba et al., 2009). Además, se encuentra presente en bebidas fermentadas como el vino y la cerveza (30-100 ng/mL) debido a que es sintetizado por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Boronat et al., 2020); (Soldevila-Domenech et al., 2019).

Respecto a las concentraciones de HT en vinos tintos y blancos (Tabla 11), las concentraciones en vinos tintos se encuentran entre 490 ng/mL y 9600 ng/mL, mientras que en el caso de los vinos blancos las concentraciones son bastante inferiores (200 ng/mL y 2700 ng/mL).

Tabla 11. Concentraciones de hidroxitirosol en vinos tintos y blancos

Tipo de vino	Variedad	Concentración de hidroxitirosol (ng/mL)	Referencia
Tintos	Montepulciano	500	Minussi et al., 2003
	Barbera	9600	
	Blended	5900	
	Nero d'Avola	-	De la Torre et al., 2006
	Merlot	-	
	Cabernet, Syrah, Petit-Verdot	-	
	Blend	2900	
	Negroamaro	3400	Ragusa et al., 2017
	Primitivo	2500	
	Susumaniello	2700	
	Tempranillo	2400	
	Petit Verdot	3220	
	Syrah	970	
	Blasco	1550	Piñeiro et al., 2011
	Cabernet Sauvignon	4320	
	Merlot	1770	
	Tintilla de Rota	2160	
	Melonera	490	
	<i>Vitis silvestris</i>	1190	
	Palomino negro	1100	
	Rome	1770	
	Garnacha	1150	
	Lemberger	-	
	Kadarka	-	
	Baco Noir	-	
	Maréchal Foch	-	
	Villa Adami	4080	Di Tommaso et al., 1998
Chianti Classico	3660		
Collesecco Rubino	4200		
Barbera del Monferrato	3660		
Piave Merlot	3860		
Trebbiano d'Abruzzo	1920		
Galestro Ruffino	1860		
Bolla Soaveb	1780		
Grigio Di Ca'Vit	1740		
Corvo	1720		
Bianco d'Alessano	900	Ragusa et al., 2017	
Blend	1300		
Chardonnay	2300		
Falanghina	800		
Fiano	1100		
Malvasia	600		
Moscato	200		
Negroamaro	600		
Verdecca	400		
Greco di Tufo	2700		Minussi et al., 2003
Pinot Grigio	1900		
Verdicchio	1600		

1.2.8.1. Ruta de síntesis

El HT sigue la misma ruta de síntesis que el tirosol. Este compuesto deriva del aminoácido tirosina y en esta ruta de síntesis se producen cuatro reacciones: transaminación de la tirosina, descarboxilación del 4-hidroxifenilpiruvato, reducción del 4-hidroxifenilacetaldehído (Hazelwood et al., 2008); (Sato et al., 2012); (Mas et al., 2014b), y finalmente la hidroxilación del tirosol a hidroxitirosol (Álvarez-Fernández et al., 2018) (Figura 16).

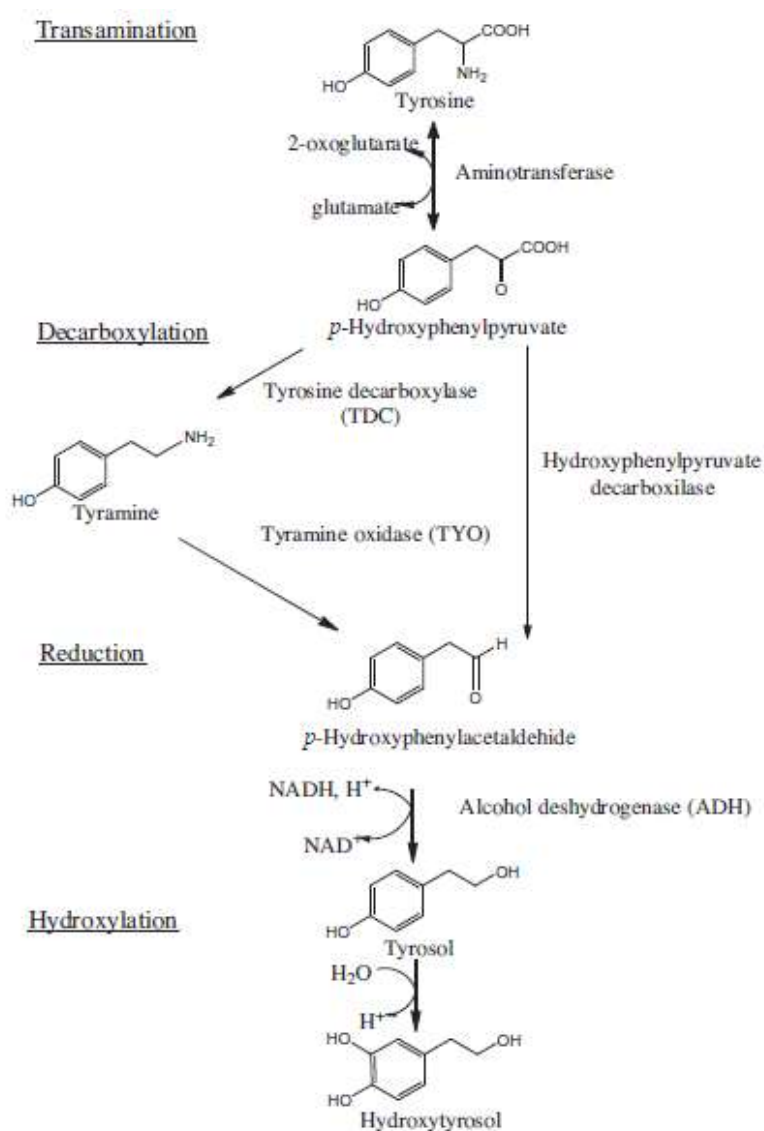


Figura 16. Ruta de síntesis del hidroxitirosol en vinos por el metabolismo de la levadura (Álvarez-Fernández et al., 2018)

1.2.8.2. Condiciones fermentativas para la producción de hidroxitirosol

A diferencia de lo expuesto en los compuestos bioactivos anteriores, existen escasos estudios sobre las condiciones fermentativas que influyen en la producción del HT (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones fermentativas para la producción de hidroxitirosol

Muestra	Microorganismo	T ^a (°C)	Azúcares		Tiempo	Concentración de hidroxitirosol	Referencia
			Fructosa	Glucosa			
Vinos Sangiovese	<i>S. cerevisiae</i> Sc1	28	128.4 ± 1.7 g/L	121.4 ± 1.4 g/L	14 días	66500 ng/mL (HT+tirosol)	Romboli et al., 2015
	<i>C.zemplinina</i> y <i>S. cerevisiae</i> Sc1					3000 ± 100 ng/mL (HT+tirosol)	
Vino Monastrell suplementado en Hys, Tyr y Trp	<i>S. cerevisiae</i> U.C.L.M. S325	22	-	-	Final (30 días)	≈ 1500 ng/mL	Bordiga et al., 2016
		16				≈ 800 ng/mL	
Vino Collesecco Rubino	-	-	-	-	-	4200 ± 160 ng/mL	Di Tommaso et al., 1998
Vino Corvo						1720 ± 20 ng/mL	
Vino Cabernet Sauvignon B	-	-	-	-	-	5020 ± 1280 ng/mL	Piñeiro et al., 2011
Vino <i>Vitis</i> <i>silvestris</i>						280 ± 490 ng/mL	

En el estudio de Romboli et al., (2015) la mayor concentración de HT + tirosol (66500 ng/mL), en uvas fermentadas de la variedad Sangiovese, se obtuvo cuando únicamente se utilizó *S. cerevisiae* Sc1, mientras que la más baja tuvo lugar con una inoculación secuencial con *C. zemplinina* seguida después de 5 días con *S. cerevisiae* Sc1 (3000 ± 100 ng/mL) (Tabla 12).

El mosto de uva Monastrell suplementado con histidina, tirosina y triptófano (50 mg/L, 25 mg/L y 10 mg/L) y fermentado a 22°C se observó la mayor concentración de HT (1500 ng/mL) en comparación con el mosto no suplementado y con el mosto solo suplementado con histidina (50 mg/L) (1000 y 1100 ng/mL de hidroxitirosol, respectivamente) (Bordiga et al., 2016). En estos ensayos se observaron que en todos los casos la concentración de hidroxitirosol fue máxima al final de la fermentación.

En el mosto de uvas Monastrell, las concentraciones máxima (≈ 1500 ng/mL) y mínima (≈ 800 ng/mL) de HT se obtuvieron al final de la FA, a 22°C y 16°C de temperaturas de fermentación, respectivamente (Bordiga et al., 2016).

La variedad de uva es un factor que influye en la síntesis de HT. En concreto, el vino tinto Collesecco Rubino fue el que obtuvo la mayor concentración (4200 ± 160 ng/mL) en comparación con los vinos tintos Chianti Classico, Collesecco Rubino, Barbera Del Monferrato y Piave Merlot y los vinos blancos Trebbiano d'Abruzzo, Galestro Ruffino, Bolla Soave, Grigio Di Ca'Vit y Corvo (1720 ± 20 ng/mL) (Di Tommaso et al., 1998). Por otra parte, en el estudio de Piñeiro et al., (2011), el vino que presentó la concentración más elevada de HT fue el vino de la variedad Cavernet Sauvignon (5020 ± 1280 ng/mL) en comparación con los vinos Tempranillo, Blasco, Petit Verdot, Syrah, Merlot, Tintilla de Rota, Melonera, Tempranillo, Palomino Negro, Rome, Garnacha y *Vitis silvestris* (280 ± 490 ng/mL) (Piñeiro et al., 2011a).

Otros factores que han demostrado influir en la síntesis de HT son la aireación en los mostos (Romboli et al., 2015), las cepas involucradas en la fermentación (Romboli et al., 2015), la composición de los mostos (Romboli et al., 2015), la cinética de la fermentación (Romboli et al., 2015), el grado de alcohol de los vinos (Bordiga et al., 2016) y la temperatura de la fermentación (Bordiga et al., 2016).

Romboli et al., (2015) manifiestan que la aireación en los mostos durante la FA hizo que la levadura *S. cerevisiae* Sc1 aumentara significativamente su tasa máxima específica de producción de CO₂ y el vigor de la fermentación, dando lugar a menores niveles de HT + tirosol. Esto destaca el papel clave de la cinética de la fermentación en la acumulación de HT + tirosol en el vino. Concretamente, la mayor concentración de HT + tirosol en uvas Sangiovese se obtuvo bajo condiciones de no aireación (mezcla diaria con los matraces cerrados) y la concentración más baja de HT + tirosol bajo condiciones de aireación (mezcla diaria con los matraces abiertos) (Romboli et al., 2015).

Bordiga et al., (2016) manifiestan que el grado alcohólico afectó de manera significativa a todos los pasos del muestreo. En concreto, el vino que dio lugar a una mayor concentración de HT tenía un grado de alcohol de 15 mientras que el que dio a la menor concentración poseía un grado de alcohol normal (12°C) (Bordiga et al., 2016).

Estos autores también mantienen que el factor temperatura afectó a todos los pasos del muestreo de manera significativa, con excepción del HT a mitad de la fermentación. Concretamente, el mosto que resultó en una mayor concentración de HT fue fermentado a 22°C (1500 ng/mL) mientras que el que dio lugar a una menor concentración a 16°C (800 ng/mL) (Tabla 12) (Bordiga et al., 2016).

1.2.8.3. Propiedades bioactivas del hidroxitirosol

El HT posee actividad antioxidante, neutralizando radicales como peroxil, hidroxil y otros radicales libres, especies reactivas de nitrógeno y aniones superóxido, rompiendo las reacciones en cadena peroxidativas y previniendo la producción catalizada por iones metálicos de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Cornwell & Ma, 2008); (Tripoli et al., 2005). Para mostrar su actividad antioxidante, Papadopoulas et al., (1991) observaron que el HT tenía un factor de protección de 15.2 a las 264 horas y de 9.5 a las 456 horas. Por otro lado, las alteraciones inducidas por H₂O₂ fueron prevenidas completamente al preincubar las células Caco-2 con HT (250 mmol/L). Cuando el estrés oxidativo fue inducido por la xantina oxidasa, se obtuvo una protección completa a una concentración tan pequeña como 100 mmol/L (Manna et al., 1997). Se ha comprobado que es un neutralizador de inhibidores de radicales derivados del ácido hipocloroso (Visioli et al., 1998). Específicamente, el HT exhibió una fuerte actividad de eliminación de radicales libres, con un EC₅₀ de 2.6×10^{-7} M en células (Visioli et al., 1998).

El HT es incluso un antioxidante más activo que el tirosol (Fernández-Mar et al., 2012) y también posee mayor poder antioxidante que antioxidantes como el ácido ascórbico (Torres de Pinedo et al., 2007). El HT mostró una capacidad de inhibición de los radicales libres de aproximadamente el 80 % de en comparación con el aproximadamente 45 % del ácido ascórbico y el casi 60% del el α -tocoferol (Torres de Pinedo et al., 2007). En el artículo de Oliveras-López et al., (2008), después de 4 días con una suplementación con 50 μ l al día de aceite, la concentración plasmática de HT en ratones que siguieron una dieta con aceite de oliva virgen extra fue 10 veces mayor que la del grupo control y 0.9 veces mayor que en el grupo de ratones que siguieron una dieta con aceite de girasol.

Con relación a la prevención del cáncer, en estudios *in vitro*, la presencia de HT reduce los efectos bioquímicos de peroxinitritos, como la desaminación de adenina y guanina en algunas líneas celulares (Deiana et al., 1999). Concretamente, una concentración de 100 mM de HT supuso más del 50% de inhibición de la nitración de tirosina en una línea celular de hibridoma neuronal N-18-RE-105 (Deiana et al., 1999). Concentraciones de 50 a 100 mM de HT provocaron una completa detención de la proliferación de células de leucemia mieloide humana HL60 y la inducción de la apoptosis (Ragione et al., 2000). Por otro lado, las concentraciones de HT que inhibieron el 50% de la proliferación celular fueron de aproximadamente 50 y 750 μ mol/l para las células HL60 y células de adenocarcinoma de colon humano HT29, respectivamente. A concentraciones entre 50

y 100 $\mu\text{mol/l}$, el hidroxitirosol indujo una apoptosis considerable en células HL60 después de 24 h de incubación (Fabiani et al., 2002).

Asimismo, el HT mejora el perfil lipídico después de su consumo continuo. La mayoría de los ensayos se han realizado con el HT presente en el aceite de oliva. En el estudio de Carluccio et al., (2003) se mostró que los compuestos fenólicos de una preparación comercial de aceitunas y aguas residuales de la almazara, administrada a varios voluntarios sanos, aumentaron los niveles totales de glutatión en el plasma. De entre los compuestos fenólicos presentes, el HT fue el compuesto bioactivo más abundante (Carluccio et al., 2003). Además, La EFSA ha declarado que el consumo de HT (y sus derivados) del aceite de oliva virgen extra contribuye a la protección del LDL del daño oxidativo. Por ello, considera el consumo de 5 mg al día de HT y sus derivados en el aceite de oliva (Panel & Nda, 2011).

Igualmente, el grado de hinchazón del grupo al que se le administraron 500 mg/kg de HT fue de un 45.14 ± 5.99 % después de 270 minutos de la administración en comparación con el grado de hinchazón de un 53.32 ± 6.97 % del grupo al que se le administraron carragenianos (compuesto presente en las algas rojas) (Gong et al., 2009).

Además, el HT aumenta la biogénesis mitocondrial en las células epiteliales pigmentarias de la retina contribuyendo a la salud ocular mediante la prevención de la degeneración de estas células inducida por el estrés oxidativo. El pretratamiento con 100 $\mu\text{mol/L}$ durante 48 h de HT suprimió el efecto de la acroleína y mejoró los niveles de proteína nuclear Nrf2 (Zhu et al., 2010).

El HT ha demostrado tener efecto antiangiogénico, crucial para la prevención de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Cerezo & Hornedo-Ortega (2019) sugieren por primera vez que el HT interactúa con los componentes de la superficie de la membrana de la célula endotelial, evitando que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) active su receptor, inhibiendo así la angiogénesis. Concretamente, en células endoteliales de la vena umbilical humana, 50 μM de HT inhibió significativamente la fosforilación del receptor-2 de VEGF en un 37 % en comparación con el control con VEGF. Según estos autores esto apoya la idea de que el HT podría unirse al VEGFR-2 o a cualquiera de sus co-receptores, inhibiendo la activación del mismo. El HT también inhibió la fosforilación de PLY1 en un 41% y activó significativamente la fosforilación de eNOS y Akt, lo que demuestra que inhibe la proliferación de las células endoteliales, mientras que de manera paralela activa la producción de óxido nítrico (Cerezo &

Hornedo-Ortega, 2019). Este hecho supone una ventaja de este bioactivo frente a los actuales fármacos anti-VEGF, ya que evitaría los problemas de hipertensión asociados al uso de estos fármacos a largo plazo.

Los resultados de Hornedo et al., (2018) hacen del HT un potente candidato neuroprotector. El HT, en células PC12, es un potente inhibidor de la agregación de α -sinucleína y un desestabilizador de fibrillas de α -sinucleína. De hecho, a altas concentraciones (100 μ M), ejerce un importante efecto inhibitor y desestabilizador (alrededor del 85% y 65%, respectivamente). Además, porcentajes de inhibición muy similares (81%) se obtienen con 50 μ M de HT (Hornedo-Ortega et al., 2018). Por otro lado, los resultados de Hornedo et al., (2018) demuestran que 25 μ M de HT, son capaces de contrarrestar totalmente la toxicidad de α -sinucleína mientras que también proporcionan alrededor de un 70% de inhibición de la formación de fibrillas de α syn. Se observó un aumento significativo en la viabilidad celular para HT a partir de 10 μ M, revirtiendo totalmente el efecto tóxico de α -sinucleína y alcanzando la viabilidad del control (100%) a 25 μ M (Hornedo-Ortega et al., 2018).

El HT tiene actividad antimicrobiana frente a varias cepas de bacterias que son agentes ocasionales de infecciones del tracto intestinal o respiratorio en humanos (Bisignano et al., 2010). Concretamente, las concentraciones inhibitorias mínimas del HT contra las bacterias *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Staphylococcus aureus* fueron de 0.24 y 7.85 μ g/mL de HT y frente a las bacterias *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella species*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, etc. fueron de 0.97 y 31.25 μ g/mL (Bisignano et al., 2010). También este compuesto es altamente tóxico para fitopatógenos como *Pseudomonas syringae pv savastanoi* y *Corynebacterium michiganense* (Capasso et al., 1995).

Esta tesis está centrada en el HT, concretamente, en las estrategias (cepas de levaduras involucradas en la fermentación, concentración inicial de tirosina del mosto, composición del mosto, variedad de uva, temperatura de fermentación y esterilización del mosto) para aumentar la producción de este compuesto bioactivo en vinos.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

El HT es un compuesto que presenta propiedades bioactivas siendo conocido por su potente efecto antioxidante (Tripoli et al., 2005); (Cornwell & Ma, 2008). También posee otras propiedades beneficiosas para la salud al ser un compuesto anti-inflamatorio (Gong et al., 2009), cardioprotector (Panel & Nda, 2011), antimicrobiano (Bisignano et al., 2010), anticancerígeno (Cornwell & Ma, 2008); (Roleira et al., 2015), etc.

Se encuentra presente en bebidas fermentadas como el vino, tanto en blancos como en tintos (Romboli et al., 2015).

El HT es producido por las levaduras durante la FA (Álvarez-Fernández et al., 2018); (Hazelwood et al., 2008). La fuente preferida de nitrógeno para las levaduras *S. cerevisiae* es el amonio. Sin embargo, en condiciones en las que este compuesto está restringido, las levaduras pueden usar otras fuentes de nitrógeno como los aminoácidos. Cuando esto ocurre, las levaduras siguen la ruta de Ehrlich (Mas et al., 2014). En el caso del HT, es producido a partir del aminoácido aromático tirosina (Álvarez-Fernández et al., 2018); (Hazelwood et al., 2008).

Existen escasos estudios que hayan evaluado el efecto de las diferentes condiciones de fermentación (sustrato de partida, variedad de uva, aireación, grado alcohólico y temperatura de fermentación) sobre la concentración final de HT en bebidas fermentadas (Romboli et al., 2015); (Bordiga et al., 2016); (Di Tommaso et al., 1998); (Piñeiro et al., 2011).

Por tanto, la hipótesis de esta Tesis Doctoral está fundamentada en que la presencia de HT en productos fermentados como el vino se debe en parte al metabolismo de las levaduras y que un mayor conocimiento de las condiciones de fermentación puede conducir a incrementar la producción de HT con el fin de obtener vinos más ricos en este compuesto bioactivo.

2.2 OBJETIVOS

La Tesis Doctoral tiene como objetivo general evaluar el efecto de la cepa de levadura, la concentración inicial de tirosina en el mosto, el tipo de mosto, la variedad de uva, la temperatura de fermentación y la esterilización del mosto en el aumento de la producción de HT en vinos.

Los objetivos específicos, son los siguientes:

1. Evaluación de la producción de HT, en mosto sintético, por diferentes cepas de levaduras (*S. cerevisiae* Aroma White, *S. cerevisiae* ES 488, *S. cerevisiae* ICV GRE, *S. cerevisiae* QA23, *S. cerevisiae* RF, *S. cerevisiae* Uvaferm, *T. delbrueckii* Biodiva TD291, *M. pulcherrima* Flavia MP346, *S. cerevisiae* Yero 2.23 y *S. cerevisiae* Yero 2.24) para seleccionar aquella que de lugar a una mayor producción de este compuesto y determinar si la cepa de levadura es un factor que influye en la producción de HT (*Capítulo 1*).
2. Estudio de la producción de HT, en mosto sintético, por la cepa seleccionada (*S. cerevisiae* RF) a partir de diferentes concentraciones iniciales de tirosina (10 mg/L y 60 mg/L) para determinar, si a mayor contenido de tirosina en el mosto, mayor producción de HT, es decir, si diferentes concentraciones de tirosina en el mosto inicial influyen en la producción final de HT (*Capítulo 2*).
3. Determinación de la producción de HT, por la cepa RF, en mostos de uva natural (Chardonnay y Palomino Fino) para verificar si el tipo de mosto es un factor que influye en la producción de este compuesto bioactivo (*Capítulo 3*).
4. Análisis de la producción de HT y tirosol, por la cepa RF, en mostos de uva natural (Pedro Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino) para evaluar si la esterilización del mosto y la temperatura de fermentación son dos factores que influyen en la producción de HT (*Capítulo 4*).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los materiales utilizados para la realización de la presente Tesis Doctoral:

3.1. MATERIALES

3.1.1. PATRONES ANALÍTICOS

Se prepararon disoluciones de patrones de los siguientes compuestos para la cuantificación de las muestras en el UHPLC/HRMS:

- HT (Oshia Biotecnología, 4999 S) (1.56-200 ng/mL)
- Tirosina (TYR) (Sigma-Aldrich, 93829) (1-500 ng/mL)
- Tirosoil (TYL) (Sigma-Aldrich, 188255) (39.06-5000 ng/mL)

3.1.2. CEPAS DE LEVADURAS

Para el desarrollo del *Capítulo 1* de la presente Tesis Doctoral se utilizaron 10 cepas de levaduras: 8 *S. cerevisiae* (6 comerciales y 2 autóctonas) y 2 de los géneros *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* (Tabla 13).

Tabla 13. Cepas de levaduras empleadas en el Capítulo 1.

Cepa de levadura	
Comercial	Autóctona
<i>S. cerevisiae</i> Enartis Ferm Aroma White (Enartis)	<i>S. cerevisiae</i> Yero 2.23 (Rancho de la Merched, IFAPA, Jerez de la Frontera)
<i>S. cerevisiae</i> Enartis Ferm ES488 (Enartis)	<i>S. cerevisiae</i> Yero 2.24 (Rancho de la Merched, IFAPA, Jerez de la Frontera)
<i>S. cerevisiae</i> Lalvin ICV GRE (Lallemand)	
<i>S. cerevisiae</i> Lalvin YSEO QA23 (Lallemand)	
<i>S. cerevisiae</i> Enartis Ferm RF (Enartis)	
<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm (Lallemand)	
<i>T. delbrueckii</i> Biodiva TD291 (Lallemand)	
<i>M. pulcherrima</i> Flavia MP346 (Lallemand)	

En el caso de los *Capítulos 2-4* solo se utilizó, para el desarrollo de las fermentaciones, la cepa de levadura *S. cerevisiae* RF.

3.1.3. MUESTRAS

3.1.3.1. Mosto sintético

Para la elaboración del mosto sintético se emplearon los reactivos que aparecen en la Tabla 14. La composición del mosto sintético se basó en Riou et al. (1997) con algunas modificaciones. Este mosto sintético se ha empleado en el *Capítulo 1* para evaluar la producción de hidroxitirosol a partir de diferentes cepas de levaduras.

Tabla 14. Reactivos empleados en la elaboración del mosto sintético (MS300)

Elemento principal	Compuesto	Concentración (g/L)	Proveedor
Azúcares	Fructosa	100	Sigma-Aldrich
	Glucosa	100	Sigma-Aldrich
Ácidos	Ácido málico	5	VWR
	Ácido cítrico	0.5	Panreac
	Acido tartárico	3	VWR
Minerales	Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.75	Merck
	Bisulfato potásico (KH_2SO_4)	0.5	VWR
	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.25	Merck
	Cloruro sódico (NaCl)	0.2	VWR
	Cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.155	Merck
Cloruro de amonio	(NH_4Cl)	0.46	Sigma-Aldrich
Solución de aminoácidos	Tirosina	1.5	Sigma-Aldrich
	Triptófano	13.4	
	Isoleucina	2.5	
	Ácido aspártico	3.4	
	Ácido glutámico	9.2	
	Arginina	28.3	
	Leucina	3.7	
	Treonina	5.8	
	Glicina	1.4	
	Glutamina	38.4	
	Alanina	11.2	
	Valina	3.4	
	Metionina	2.4	
	Fenilalanina	2.9	
	Serina	6	
	Histidina	2.6	
	Lisina	1.3	
Cisteína	1.6		
Prolina	46.1		
Bicarbonato sódico	20		

Solución de vitaminas	Mioinositol	2	Sigma-Aldrich
	Pantotenato de calcio	0.15	Sigma-Aldrich
	Clorhidrato de tiamina	0.025	Merck
	Ácido nicotínico	0.2	Sigma-Aldrich
	Piridoxina	0.025	Sigma-Aldrich
	Biotina	0.003	Sigma-Aldrich
Solución de oligoelementos	Sulfato de manganeso hidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	4	Sigma-Aldrich
	Sulfato de zinc hidratado (ZnSO ₄ ·H ₂ O)	4	Panreac
	Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1	Sigma-Aldrich
	Yoduro de potasio (KI)	1	Sigma-Aldrich
	Cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.4	Sigma-Aldrich
	Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	1	Panreac
	Molibdato de amonio (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1	Sigma-Aldrich

Para la elaboración del mosto sintético utilizado en el *Capítulo 2* para evaluar la producción de hidroxitirosol a partir de diferentes concentraciones de tirosina, se emplearon los mismos reactivos (Tabla 14), con las modificaciones expuestas en la Tabla 15.

Tabla 15. Modificaciones en el contenido de sulfato de amonio y tirosina del mosto sintético (MS300) utilizado en el Capítulo 2

Compuesto	Concentración	
	Baja concentración de tirosina	Alta concentración de tirosina
Sulfato de amonio	3.28 g/L	3.19 g/L
Tirosina	10 mg/L	60 mg/L

3.1.3.2. Mosto natural

Para la evaluación de la producción de HT y tirosina en mostos de uva natural con la cepa de levadura seleccionada (*Capítulo 3*), se utilizaron los mostos de uva Chardonnay y Palomino Fino (variedades de uva blanca) tal como se muestra en la Figura 17.

Por otro lado, para la evaluación del efecto de la temperatura de fermentación (18°C y 25°C) y de la esterilización o no del mosto en la producción de HT y tirosol (*Capítulo 4*) se utilizaron los mostos de uva Pedro Ximénez y Palomino Fino (variedades de uva blanca) y Tempranillo (variedad de uva tinta) (Figura 18).

Los cuatro mostos de uva fueron aportados por el El Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) del Rancho de la Merced de Jerez de la Frontera, España (Longitud 06:00:58 O, Latitud 36:45:29 N).



Figura 17. Mostos naturales Palomino Fino y Chardonnay durante la fermentación alcohólica



Figura 18. Mostos naturales Pedro Ximénez y Tempranillo durante la fermentación alcohólica

3.1.4. MEDIO YPD

Para que las levaduras pudiesen crecer previo a la inoculación del mosto se elaboró el medio para el crecimiento de las levaduras (YPD) (Tabla 16).

El medio líquido contiene extracto de levadura, glucosa y peptona y el medio sólido, aparte de lo anterior, contiene agar.

Tabla 16. Composición del medio de crecimiento para las levaduras

Compuesto	Porcentaje	Proveedor
Extracto de levadura	1	VWR
Glucosa	2	Sigma-aldrich
Peptona	2	Fisher Scientific Bioblock
Agar	2	VWR

3.1.5. OTROS REACTIVOS

3.1.5.1. Inactivación celular (quenching)

Los reactivos utilizados en el proceso de inactivación celular se detallan a continuación:

- Glicerol, ultrapuro 99.5% (VWR International Eurolab)
- Solución de glicerol en frío: 3:2 muestra (glicerol/solución 1.35% (p/v) NaCl). Almacenamiento a -20°C en un baño de etilen glicol
- Solución de lavado: 1:1 muestra (glicerol/solución 1.35% NaCl). Almacenamiento a -20°C

3.1.5.2. Extracción de metabolitos intracelulares

Los reactivos empleados en el procedimiento de extracción de metabolitos intracelulares son:

- Etilen glicol (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Solución de extracción: 1:1 muestra (metanol/agua). Almacenamiento a -30°C en un baño de etilen glicol

3.1.5.3. Extracción en fase sólida (SPE) y resuspensión

Los reactivos usados para el SPE son:

- Ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol HiPerSolv CHROMANORM (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)

- Acetonitrilo LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Alemania)

3.1.5.4. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC/HRMS)

Los reactivos utilizados en el UHPLC/HRMS se muestran a continuación:

- Ácido acético calidad LC-MS (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Ácido fórmico calidad LC-MS (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Acetonitrilo calidad LC-MS (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Metanol calidad LC-MS (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)

3.1.6. INSTRUMENTACIÓN

3.1.6.1. Aparatos

Los aparatos empleados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- Agitador magnético con calefacción (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Agitador de vortex avanzado ZX3 (Velp Scientifica, Italia)
- Agitador orbital MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania)
- Agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, Nueva York, EE.UU)
- Agujas estériles (0,8x120 mm) Sterican® (Braun, Mensulgen, Alemania)
- Agujas estériles Becton Dickinson Microlance 3 (Huesca, España)
- Autoclave modelo AES 75L (Raypa, Barcelona, España)
- Balanza FV-120 C (Gram FV, Barcelona, España)
- Bomba de vacío MZ2CNT (Vacuubrand, Wetheim, Alemania)
- Cabina de seguridad biológica modelo Advantage (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania)
- Cámara de Neubauer improved (Marienfeld, Alemania)
- Cartuchos desechables de SPE Mega BE-C18, 1 gm, 3 mL (VARIAN, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU)
- Cartuchos desechables de SPE "Phree™ Phospholipid Removal" de 1 mL (Phenomenex® Torrance, California, EE.UU)
- Centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, Pasadena, California, EE.UU)
- Centrífuga Sorvall LYNK 6000 (ThermoFisher scientific, Waltham, MAUSA)
- Centrífuga diferencial con rotor para tubos falcon de 15 ml modelo 3D-30 (Sigma-Aldrich, Barcelona, España)

- Concentrador de vacío HyperVac-Lite (Gyrozen, Korea)
- Eppendorff ámbar de poliprolileno de 1,5 mL y 2 mL (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Eppendorff de poliprolileno de 1,5 mL y 2 mL (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Equipo de Agua MilliQ modelo NANOpure Diamond (Barnstead, Alemania)
- Espectrofotómetro visible Genesys™ 20 (Thermo Scientific, EEUU)
- Filtros de jeringa de 13 mm (0.2 µM) de membrana de nylon (Whatman, Buckinghamshire, UK)
- Filtros enroscables para la parte superior de frascos estériles desechables Nalgene® (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania)
- Filtros estériles de jeringa de 25 mm (0.2 µM) de membrana de acetato de celulosa (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Incubadora de CO₂ para levaduras (INCO, Barcelona, España)
- Jeringas estériles sin aguja de 5, 10 y 20 mL, Becton Dickinson Discardit™ II (Huesca, España)
- Kit de azúcares residuales D-fructosa y D-glucosa (kit de ensayo Megazyme International, Irlanda)
- Kit de etanol (kit de ensayo de etanol Megazyme International, Irlanda)
- Kit de nitrógeno amino primario (PANOPA) (kit de ensayo de nitrógeno amino primario Megazyme International, Irlanda)
- Lector de placas multimodal para medidas de fluorescencia, luminiscencia y absorbancia modelo Synergy HT (BioTek®, Izasa Scientific, Barcelona, España)
- Matraces Erlenmeyer (Schott Duran, Alemania)
- Medidor pH Basic 20 (Crison, Barcelona, España)
- Microinsertos para viales de HPLC de 0,1 mL con muelle (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Microinsertos para viales de HPLC de 0.2 mL (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Micropipetas (Eppendorf Research plus, Hamburgo, Alemania)
- Micropipeta multicanal (Eppendorf Research plus, Hamburgo, Alemania)
- Microfuge 18 Centrifuge (Beckman Coulter, Pasadena, California, EE.UU)
- Pipeta automática FastPette™ V2 (Labnet International, Edison, EE.UU)
- Pipetas estériles serológicas de 5, 10 y 25 mL (ALP, Chorges, Francia)
- Placas de 96 pocillos transparentes (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Puntas desechables para micropipetas (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)

- Sistema de SPE al vacío Supelco-Visiprep (Sigma-Aldrich, Barcelona, España)
- Sonificador Ultrasónico (Sonics vibra cell™, EE.UU)
- Tapones de caucho natural perforados de 40 mm (diámetro superior) x 0,41 mm (diámetro inferior) x 40 mm (altura) (Saint-Gobain, Francia)
- Tapones de rosca para viales de PTFE con septum rojo de 1 mm (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)
- Tubos de centrífuga estériles de 15 mL de polipropileno Falcon ® (Corning, Nueva York, EE.UU)
- Tubos para centrífuga de policarbonato Nalgene (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania)
- Vasos de precipitado (VWR, Alemania)
- Viales ámbar de HPLC de 1,5 mL (32 x 11.6 mm) (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU)

3.1.6.2. Equipos de cromatografía

Se emplearon:

- Equipo de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) consistente en un híbrido de cuadrupolo/Orbitrap® Qexactive (ThermoFisher Scientific, EE.UU) con fuentes de ionización ESI acoplado a un sistema de UHPLC (ThermoFisher Scientific, EE.UU)
- Columnas de UHPLC SB-C18 (2.1 × 100 mm, 1.8-µm tamaño de la partícula) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU)
- Precolumnas para columnas de UHPLC ZORBAX SB-C18 (2.1 x 5 mm, 1,8 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU)

El software informático usado se muestra a continuación:

- Thermo Fisher Scientific Xcalibur Software (control de aparatos y obtención de datos)
- Thermo Fisher Scientific TraceFinder Software (tratamiento de datos). Versiones 3.3 y 5.1

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ELABORACIÓN DEL MOSTO SINTÉTICO: *Capítulos 1 y 2*

Para la elaboración de mosto sintético (Figura 19) se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se preparan las diferentes soluciones de aminoácidos, vitaminas y oligoelementos (Tabla 14). Los aminoácidos se disuelven en una solución al 2% de bicarbonato de sodio y las soluciones de vitaminas y oligoelementos se preparan en agua milliQ.
2. Se añade agua destilada a un matraz para tener un volumen final de 3 L de mosto sintético (*Capítulo 1*) y 5 L (*Capítulo 2*).
3. Se pone el matraz en agitación a temperatura ambiente.
4. Se añaden los diferentes compuestos y soluciones:
 - Azúcares
 - Ácidos
 - Minerales
 - Cloruro de amonio
 - Solución de aminoácidos
 - Solución de vitaminas
 - Solución de oligoelementos
5. Se ajusta el pH a 3.3 con NaOH (VWR)
6. Se esteriliza por filtrado (0.2 μm).
7. Se almacena a 4°C hasta la preinoculación ese mismo día o al día siguiente.



Figura 19. Elaboración del mosto sintético

Para la elaboración de mosto sintético con el objetivo de evaluar la producción de hidroxitirosol a partir de diferentes concentraciones de tirosina se siguieron los mismos pasos que en la elaboración del mosto anterior, con excepción del paso 4:

Se añaden los diferentes compuestos y soluciones:

- Azúcares
- Ácidos
- Minerales
- Sulfato de amonio
- Tirosina
- Solución de vitaminas
- Solución de oligoelementos

Para la determinación de las cantidades de sulfato de amonio y tirosina a añadir a los mostos sintéticos, se partió de una concentración de nitrógeno asimilable para las levaduras (YAN) de 140 mg/L que es la concentración mínima de nitrógeno disponible para las levaduras necesaria para la fermentación. Por otro lado, las concentraciones iniciales de tirosina de los mostos sintéticos fueron de 10 mg/L, para el ensayo de baja concentración de tirosina, y de 60 mg/L, para el ensayo de alta concentración.

3.2.2 ELABORACIÓN DEL MOSTO NATURAL: *Capítulos 3 y 4*

La elaboración del mosto natural se llevó a cabo en el centro IFAPA el Rancho de la Merched (Jerez de la Frontera, Cádiz). Las uvas fueron cosechadas, desgranadas, machacadas y prensadas. A continuación, se les añadieron a los mostos 2.5 mL/hL de enzimas pectolíticas y 40 mg/L de SO₂ durante 24 horas a 4°C. Después de esto, los mostos exprimidos se almacenaron en un recipiente de acero de 100 L.

3.2.3. PREINOCULACIÓN: *Capítulos 1-4*

Antes de inocular el mosto, cada cepa de levadura liofilizada se rehidrató en un baño a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las levaduras se sembraron en placas de medio sólido de YPD. Las cepas se sembraron por duplicado. A continuación, se incubaron en la estufa a 28°C durante 48-72 horas. Tras observar crecimiento en las placas, las levaduras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Posteriormente, los preinóculos, se prepararon en medio YPD líquido esterilizado. Se cogieron las colonias de las placas de YPD sólido, con un asa de siembra, y se introdujeron en un matraz de YPD. Seguidamente, el preinóculo se incubó en un agitador orbital a 25°C y 150 rpm durante 12-24 h, hasta la inoculación.

3.2.4. INOCULACIÓN: *Capítulos 1-4*

Para la inoculación, se contó el número de células del preinóculo, por duplicado, en la cámara de Neubauer.

Antes de la inoculación, se realizó un lavado con agua destilada. Para ello, las muestras se centrifugaron a 3500-5000 rpm durante 3-5 minutos. Seguidamente, los sobrenadantes se desecharon y los pellets se lavaron con agua destilada y se volvieron a centrifugar. El proceso de lavado y centrifugación se repitió dos veces. Los mostos tanto sintéticos como naturales se inocularon con una concentración de 10^6 células/mL.

3.2.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA: *Capítulos 1-4*

En las fermentaciones alcohólicas del *Capítulo 1* (evaluación de la producción de HT por diferentes cepas de levaduras) el mosto sintético fue inoculado con 10^6 células/mL. Estos matraces se taparon con tapones de goma los cuales tenían una abertura que contenía una jeringa para liberar el CO_2 producido durante la fermentación. Después de la inoculación, los matraces se incubaron a 25°C con una agitación de 150 rpm para empezar con la fermentación alcohólica.

En las fermentaciones alcohólicas del *Capítulo 2* (evaluación de la producción de HT a partir de diferentes concentraciones de tirosina) el mosto sintético fue inoculado con 10^6 células/mL. Los matraces se taparon con tapones de goma y se incubaron a 25°C con una agitación de 150 rpm para empezar con la fermentación alcohólica.

En las fermentaciones alcohólicas con el objetivo de evaluar la producción de HT en mostos naturales, matraces con 750 mL de mostos de uva natural (Chardonnay y Palomino Fino) fueron inoculados con 10^6 células/mL. Previamente los mostos fueron esterilizados a 100°C durante 10 minutos. Los matraces se taparon con tapones de goma y se incubaron a 25°C con una agitación de 150 rpm para empezar con la fermentación alcohólica.

En las fermentaciones alcohólicas con el objetivo de evaluar la producción de HT y tirosol para analizar el efecto de la temperatura de fermentación y de la esterilización o no del mosto, matraces con 80 mL de mostos de uva natural (Pedro Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino) fueron inoculados con 10^6 células/mL. Previamente algunos mostos fueron esterilizados a 100°C durante 10 minutos. Los matraces se taparon con tapones de goma y se incubaron a 25°C y a 18°C con una agitación de 150 rpm para empezar con la fermentación alcohólica.

Las fermentaciones alcohólicas se llevaron a cabo en el laboratorio de la Universidad Pablo de Olavide (Figura 20).



Figura 20. Fermentación alcohólica de los mostos

Para realizar las fermentaciones alcohólicas con el objetivo de seleccionar la cepa mayor productora de HT (*Capítulo 1*) se utilizaron diez cepas de levaduras: *S. cerevisiae* Aroma White, *S. cerevisiae* ES488, *S. cerevisiae* ICV GRE, *S. cerevisiae* QA23, *S. cerevisiae* RF, *S. cerevisiae* Uvaferm, *T. delbrueckii* Biodiva TD291, *M. pulcherrima* Flavia MP346, *S. cerevisiae* autóctona Yero 2.23 y *S. cerevisiae* autóctona Yero 2.24.

Para las fermentaciones restantes, con los objetivos de evaluar la producción de HT, a partir de diferentes concentraciones de tirosina en mostos sintéticos (*Capítulo 2*) y en mostos naturales (*Capítulo 3*) y evaluar la producción de HT y tirosol en mostos naturales (*Capítulo 4*) se utilizó la cepa *S. cerevisiae* RF.

Las fermentaciones alcohólicas se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C, a excepción de las fermentaciones realizadas en el Capítulo 4 que tuvieron lugar a 25 °C y a 18 °C para evaluar el efecto de la temperatura en la producción de HT y tirosol. Todas las fermentaciones alcohólicas se realizaron por triplicado. Las fermentaciones se monitorizaron a través de la medición de CO₂, de la medición de la densidad óptica (DO) y de las mediciones de los contenidos de etanol, azúcares residuales y nitrógeno con kits enzimáticos (3.1.6.1.).

3.2.5.1. Medición de CO₂ desprendido

La monitorización de las fermentaciones tuvo lugar pesando los matraces para cuantificar el desprendimiento de CO₂ hasta la estabilización del peso.

Los días en los que se pesaron los mostos fueron diferentes (Tabla 17).

Tabla 17. Medición de CO₂ de los mostos de las diferentes experiencias

Capítulo	Tipo de mosto	Pesada (días)
1	Sintético	0-7
2	Sintético	0-6, 8 y 10
3	Natural	0-7
4	Natural	0-9

3.2.5.2. Medición de la densidad óptica

Las fermentaciones también se monitorizaron a través de la medición de la DO.

Para ello, se pone el espectrofotómetro a 600 nm. Antes de medir la absorbancia de las muestras, se mide de una muestra de agua destilada que hace de blanco. Después, se miden las absorbancias de las diferentes muestras. El resultado debe salir entre 0.02 y 0.8. Para que salga dentro de ese rango se miden las muestras originales y diferentes diluciones de las muestras (1:10 y 1:100).

3.2.5.3. Mediciones de etanol, azúcares residuales y nitrógeno

En las fermentaciones alcohólicas con el objetivo de evaluar la producción de HT a partir de diferentes concentraciones iniciales de tirosina, se midieron los contenidos de etanol, azúcares residuales y nitrógeno siguiendo las especificaciones del kit, como se explica a continuación:

Medición de etanol (K-ETOH)

Para medir la producción de etanol se utilizaron las siguientes soluciones y se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Preparativos:
 - Solución buffer
 - Solución NAD⁺: disolver en 12.4 mL de agua destilada
 - Solución aldehído deshidrogenasa
 - Solución alcohol deshidrogenasa
 - Solución patrón etanol: diluir 0.5 mL en 50 mL de agua destilada (5 mg/mL)
- Procedimiento:
 1. Se rellenan los pocillos de las placas con las cantidades reflejadas en la Tabla 18, a excepción de los 2 µL de la solución de alcohol deshidrogenasa.

Tabla 18. Medida de etanol

	Blanco (μL)	Muestra (μL)	Patrón (μL)
Agua destilada	210	200	200
Muestra	-	10	-
Patrón	-	-	10
Solución buffer	20	20	20
Solución NAD⁺	20	20	20
Solución aldehído deshidrogenasa	5	5	5
Solución alcohol deshidrogenasa	2	2	2

2. Se agitan las placas.
3. Se hace una lectura para leer la absorbancia a los 2 minutos. Para esa lectura se le pone al lector de placas una longitud de onda de 340 nm y una temperatura de 25°C. El rango lineal es de 0.1-1.2 μg de etanol por pocillo de la placa.
4. Se continúa añadiendo 2 μL de la solución de alcohol deshidrogenasa.
5. Se agitan las placas.
Se hace una lectura para leer la absorbancia a los 5 minutos (si la reacción no ha finalizado, se mide cada 1 minuto hasta que la lectura de la absorbancia sea estable).

Medición de azúcares residuales: glucosa y fructosa (K-FRUGL)

Para medir el consumo de azúcares residuales se usaron las siguientes soluciones y se siguió el proceso siguiente:

- Preparativos:
 - Solución buffer
 - Solución NASP⁺, ATP, PVP: disolver en 12 mL de agua
 - Solución hexoquinasa + glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
 - Solución fosfoglucoasa isomerasa
 - Solución patrón D-glucosa+fructosa: diluir en agua destilada (0.2 mg/L)
- Procedimiento:
 1. Se rellenan los pocillos de las placas con las cantidades de la Tabla 19, a excepción de los 4 μL de la solución de hexoquinasa+glucosa 6 fosfato deshidrogenasa+solución fosfoglucoasa isomerasa

Tabla 19. Medida de los azúcares residuales

	Blanco (µL)	Muestra (µL)	Patrón (µL)
Agua milliQ	210	200	200
Muestra	-	10	-
Patrón	-	-	10
Solución buffer	10	10	10
Solución NADP⁺, ATP, PVP	10	10	10
Solución hexoquinasa+glucosa 6 fosfato deshidrogenasa+solución fosfoglucoasa isomerasa	4	4	4

2. Se agitan las placas.
3. Se hace una lectura para leer la absorbancia a los 3 minutos. Para esa lectura se le pone al lector de placas una longitud de onda de 340 nm y una temperatura de 25°C. El rango lineal es de 0.1-8 µg de D/glucosa y D/fructosa por pocillo de la placa.
4. Se prosigue añadiendo los 4 µL de la solución de hexoquinasa+glucosa 6 fosfato deshidrogenasa+solución fosfoglucoasa isomerasa
5. Se agitan las placas
6. Se hace una lectura para medir la absorbancia a los 10 minutos (si la reacción no se ha terminado, se mide cada 2 minutos hasta que la lectura de la absorbancia sea constante).

Medición de nitrógeno primario (K-PANOPA)

Para la medición del consumo de nitrógeno primario se emplearon las siguientes soluciones y se realizó el procedimiento que se detalla a continuación:

- Preparativos:
 - Solución N-acetil-L-cisteína (NAC): disolver la pastilla en 3 ml de agua milliQ durante 2-3 minutos.
 - Solución orto-ftalaldehído (OPA). Almacenamiento en oscuridad a 4°C
 - Solución patrón isoleucina: 140 mg N₂/L. Almacenamiento a 4°C
- Procedimiento:
 1. Se rellenan los pocillos de las placas con las cantidades de la Tabla 20, a excepción de los 10 µL de la solución de orto-ftalaldehído.

Tabla 20. Medida del nitrógeno primario

	Blanco (µL)	Muestra (µL)	Patrón (µL)
Solución N-acetil-L-cisteína	300	300	300
Agua destilada	5	-	-
Muestra	-	5	-
Solución patrón isoleucina	-	-	5
Solución orto-ftalaldehído	10	10	10

2. Se agitan las placas.
3. Se hace una lectura para medir la absorbancia a los 2 minutos. Para esa lectura se le pone al lector de placas una longitud de onda de 340 nm y una temperatura de 25°C. El rango lineal es de 0.2-1 µg de nitrógeno por pocillo de la placa.
4. Se continúa rellenando las placas con los 10 µL de la solución de orto-ftalaldehído.
5. Se agitan las placas.
6. Se hace una lectura de la absorbancia a los 15 minutos.

3.2.6. TOMA DE MUESTRAS: Capítulos 1-4

Las muestras se tomaron todos los días de fermentación excepto en el *Capítulo 1* que sólo se tomaron al final (día 7), en el *Capítulo 2* que se tomaron la mayoría de los días y en el *Capítulo 3* que se tomaron solo al inicio, mitad y final (Tabla 21). Algunas fermentaciones duraron más dependiendo de la composición del mosto (*Capítulo 2*) y de la temperatura de fermentación (*Capítulo 4*). Concretamente, las muestras fermentadas a 18 °C fueron recolectadas un día más tarde (días 6 y 9) que las fermentadas a 25 °C (días 5 y 8).

Tabla 21. Toma de muestras de las diferentes experiencias

Capítulo	Tipo de mosto	Toma de muestra (día)
1	Sintético	7
2	Sintético	0-6, 8 y 10
3	Natural	0-7
4	Natural	0, 5-6 y 8-9

Las muestras se recogieron en función del volumen correspondiente a 10^9 células/mL, previamente contadas en una cámara de Neubauer. A continuación, las muestras se centrifugaron, a 4500-5000 rpm durante 3 minutos, para separar los pellets (parte intracelular) del contenido extracelular. Seguidamente, los sobrenadantes se recogieron para ser posteriormente filtrados y guardados a -80°C hasta su análisis. Por otro lado, los pellets se lavaron con agua destilada y se volvieron a centrifugar. El proceso de lavado y centrifugación se volvió a repetir. De esta manera, se eliminó la presencia de analitos del compartimento extracelular. Posteriormente las muestras se guardaron a -80°C hasta el procedimiento de inactivación celular (quenching). En el caso de los Capítulos 3-4, con mostos naturales, sólo se analizaron las muestras extracelulares.

3.2.7. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: Capítulos 1-4

La Figura 21 muestra un esquema del tratamiento de las muestras hasta su análisis por espectrometría de masas.

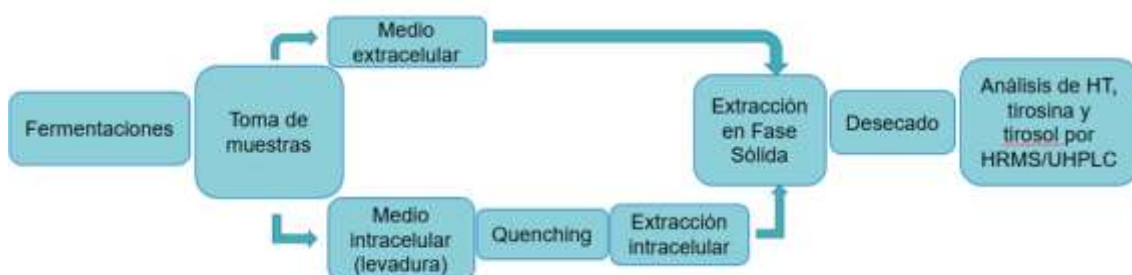


Figura 21. Esquema del tratamiento de muestras

3.2.7.1. Inactivación celular (quenching)

Las muestras intracelulares se sometieron a un procedimiento de inactivación enzimática, el cual fue publicado por Villas-Bôas & Bruheim, (2007) y consiste en detener el metabolismo de las células.

Este procedimiento tuvo lugar en el laboratorio de la Universidad Pablo de Olavide y en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD).

- Preparativos:
 - La centrifuga se deja, en modo HOLD, a -20°C y a 5000 rpm ya que tarda en coger temperatura.
 - Se ponen en hielo los adaptadores para la ultracentrífuga y la solución de quenching de glicerol en frío.

- Procedimiento:
 1. Se resuspenden los pellets de las levaduras con 1 mL de agua milliQ.
 2. Se trasladan las levaduras a un tubo de policarbonato apto para ultracentrífugas.
 3. Se añaden 4 mL de la solución de glicerol en frío a cada tubo.
 4. Se vortexean las muestras.
 5. Se dejan en hielo al menos 5 minutos.
 6. Se centrifugan las muestras a 36.086 g durante 20 minutos a -20°C.
 7. Se deja la centrífuga, en modo HOLD, a -20°C y a 5000 rpm para que vaya alcanzando esa temperatura mientras que se hacen los pasos siguientes hasta que se vuelvan a centrifugar otra vez las muestras (paso 11).
 8. Se descartan los sobrenadantes.
 9. Se añaden 2 mL de la solución de lavado a cada tubo.
 10. Se vortexean hasta resuspender los pellets.
 11. Se centrifugan las muestras a 36.086 g durante 20 minutos a -20°C.
 12. Se descartan los sobrenadantes.
 13. Se guardan las muestras a -80°C hasta el momento de la extracción de los metabolitos intracelulares.

3.2.7.2. Extracción de metabolitos intracelulares

Los metabolitos intracelulares se extrayeron siguiendo procedimiento descrito por Álvarez-Fernández (Álvarez-Fernández et al., 2019), con algunas mínimas modificaciones.

La extracción de metabolitos intracelulares se realizó en el laboratorio de la Universidad Pablo de Olavide y en el CABD.

- Procedimiento:
 1. Se añaden 2.5 mL de la solución de extracción a los pellets.
 2. Se vortexean hasta resuspender levaduras.
 3. Se llevan las muestras a un congelador de -80°C durante 30 minutos.
 4. Se descongelan las muestras poniéndolas en hielo durante 5 minutos.
 5. Se llevan a un congelador de -80°C durante 30 minutos.
 6. Se pone la centrífuga, en modo HOLD, a -20°C y a 5000 rpm para que vaya alcanzando esa temperatura mientras que se hacen los pasos siguientes hasta que se vuelvan a centrifugar otra vez las muestras (paso 9).
 7. Se descongelan las muestras poniéndolas en hielo durante 5 minutos.

8. Se aplica ultrasonido a las muestras en hielo durante 1 minuto a máxima potencia (90 Hz).
9. Se centrifugan las muestras a 36.086 g durante 20 minutos a -20°C.
10. Se recolectan los sobrenadantes en viales de vidrio.
11. Se añaden 2,5 mL de la solución de extracción a los pellets.
12. Se vortexean las muestras hasta resuspender levaduras.
13. Se repiten los pasos 9 y 10 y se conservan los sobrenadantes a -80°C.

3.2.7.3. Extracción en fase sólida

Las muestras extra e intracelulares se sometieron a un procedimiento de extracción en fase sólida (SPE), tal como se muestra en la Figura 22, para eliminar aquellos compuestos que pudieran interferir en el análisis de la muestra, como son fosfolípidos y proteínas en el caso de las muestras intracelulares, además de para concentrar los compuestos de interés. Para ello se utilizan cartuchos desechables de SPE (3.1.6.1.).



Figura 22. Muestras sometidas al proceso de extracción en fase sólida

Este procedimiento tuvo lugar en el laboratorio de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla) y en el laboratorio del CITIUS (Universidad de Sevilla).

- Procedimiento de las muestras extracelulares:
 1. Se acondicionan los cartuchos con 2 mL de metanol.
 2. Posteriormente se añade 2 mL de agua milliQ.
 3. Se cargan 500 μ l de las muestras de mostos sintéticos y mostos de uva Palomino Fino y Chardonnay y 2 mL de las muestras de Pedro Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino.
 4. Se lavan las muestras con 2 mL de una solución metanol/agua al 10% (v/v).
 5. Se eluyen las muestras con 1 ml de metanol puro.

Entre cada paso se abren, poco a poco, los cartuchos para que el contenido pase con la ayuda de una bomba de vacío.

- Procedimiento muestras intracelulares:
 1. Se cargan 100 μ l de las muestras.
 2. Se añaden 400 μ l de metanol/ácido fórmico (1%).
 3. Se repite todo el proceso.

Al final del procedimiento, se abren, poco a poco, los cartuchos para que el contenido pase con la ayuda de una bomba de vacío.

3.2.7.4. Desecado y resuspensión

Las muestras, tanto extracelulares como intracelulares, se desecaron en un concentrador de vacío hasta eliminar totalmente el solvente. La desecación tuvo lugar a 2000 rpm a 30°C. Posteriormente las muestras se guardaron a -80°C.

Las muestras de mostos sintéticos y de mostos naturales de Palomino Fino y Chardonnay se resuspendieron en una solución de metanol:agua al 10% (v/v) con ácido fórmico (0.1%) y las muestras de mostos naturales Pedro Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino se resuspendieron en una solución de acetonitrilo:agua al 10% (v/v).

A continuación, las muestras tanto extra como intracelulares se centrifugaron a 10000 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

3.2.8. UHPLC/HRMS: Capítulos 1-4

El análisis de HT, tirosina y tirosol se llevó a cabo en el Servicio de Espectrometría de Masas del CITIUS (Universidad de Sevilla).

Se llevó a cabo el análisis en modo negativo para el HT y el tirosol y en modo positivo para la tirosina. El PRM del $[M+H]^-$ se estableció en 153.05572 para el HT, en 182.08117 para el tirosol y el PRM del $[M+H]^+$ se estableció en 137.06080 para la tirosina (tabla 22). La energía de colisión normalizada (NCE) se fijó en 25 eV para el HT, en 40 eV para la tirosina y en 40 eV para el análisis del HT y del tirosol en mostos de uva (Tabla 22).

Tabla 22. Ion protonado, energía de colisión y tiempo de retención de los compuestos estudiados

Patrón	[M+H]	EC (v)	Tiempo de retención (min)
Hidroxitirosol	153.05572	25	2.91
Tirosina	137.06080	40	1.22
Tirosol	182.08117	40	3.5

La temperatura usada en este análisis fue de 40°C, el flujo fue de 0.5 mL/min para el HT y 0.4 mL/min para la tirosina y el volumen de inyección fue de 5 µL.

El HT y la tirosina fueron analizados siguiendo las condiciones cromatográficas descritas las cuales consistieron en dos fases (A) solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% y (B) solución al 0,1% de ácido fórmico en metanol.

Las características de los gradientes de elución del hidroxitirosol, tirosina y tirosol aparecen recogidas en las Tablas 23, 24 y 25.

Tabla 23. Gradiente de elución I

	Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Gradiente de elución del hidroxitirosol	0-1	95	5
	1-7	0	100
	7-8.5	0	100
	8.6-10	95	5

Tabla 24. Gradiente de elución II

	Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Gradiente de elución de la tirosina	0-1	95	5
	1-3	0	100
	3-4	0	100
	4.1-5	95	5

La temperatura usada en este análisis fue de 40°C, el flujo fue de 0.4 mL/min para el HT y para el tirosol y el volumen de inyección fue de 5 µL.

Un gradiente binario que consistía en (A) agua con un 0.2% de ácido acético y (B) acetonitrilo fue usado.

Tabla 25. Gradiente de elución III

Gradiente de elución del hidroxitirosol y del tirosol	Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
	0-1	95	5
	1-7	0	100
	7-8.5	0	100
	8.5-10	95	5

Se usó un método de monitoreo de reacción en paralelo (PRM) en modo negativo en la resolución 35000 a m/z 200 FWHM. Los parámetros de la fuente HESI fueron: voltaje de pulverización de iones 3.0 kV; nivel de lente S, 50; temperatura de capilaridad, 320°C; cortina de gas 50 psi, flujo de gas auxiliar y flujo de gas de barrido, 15 y 2 unidades arbitrarias, respectivamente; y temperatura del calentador de la sonda, 425 °C.

3.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: *Capítulos 1-4*

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los softwares InfoStat (2019) y StatSoft, Inc. Statistica (versión 7). Los datos fueron sometidos a ANOVA. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias a $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se han agrupado en 4 capítulos que muestran la influencia de varios factores (cepa de levadura, concentración inicial de tirosina, tipo de mosto, variedad de uva, temperatura y esterilización) sobre la producción de HT y tirosol y el consumo del aminoácido precursor, tirosina.

Como se ha expuesto en la introducción, diversos autores han estudiado la influencia de varios factores (cepa de levadura, concentraciones de aminoácidos precursores, tipo de mosto, temperatura, aireación, esterilización del mosto, pH del mosto, sulfato de amonio del mosto, cloruro sódico del mosto, agitación, densidad celular de los cultivos, concentración de glucosa del mosto, grado de alcohol del vino, cosecha, suplementación con nutrientes del mosto, cultivo de uva, cantidad de células inoculadas, fase de crecimiento de la levadura, proceso de elaboración del vino, variedad de uva, condiciones climatológicas, cinética de la fermentación, etc.) sobre la producción de diversos compuestos con actividad biológica como el triptofol, la serotonina, el ácido 3-indolacético, la melatonina, el glutatión, el GABA, el tirosol y el HT (Gori et al., 2011); (Bordiga et al., 2016); (Simat et al., 2004); (González et al., 2018); (Fernández-Cruz et al., 2018); (Zupan et al., 2013); (Guerrini et al., 2018); (Favre et al., 2014); (Romboli et al., 2015).

CAPÍTULO 1

El *Capítulo 1* de esta tesis está dirigido a evaluar la producción de HT en mosto sintético por diferentes cepas de levaduras para seleccionar la más productora.

4.1 MONITORIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

El progreso de las fermentaciones fue seguido por las determinaciones de las pérdidas de pesos debido a la liberación de CO₂ hasta que los pesos se mantuvieron constantes.

El desprendimiento de CO₂ aumentó progresivamente desde el inicio de la fermentación (día 0) hasta los días 2-3, momento a partir del cual empezó a mantenerse prácticamente constante hasta el final de la fermentación (día 7) (Figura 23).

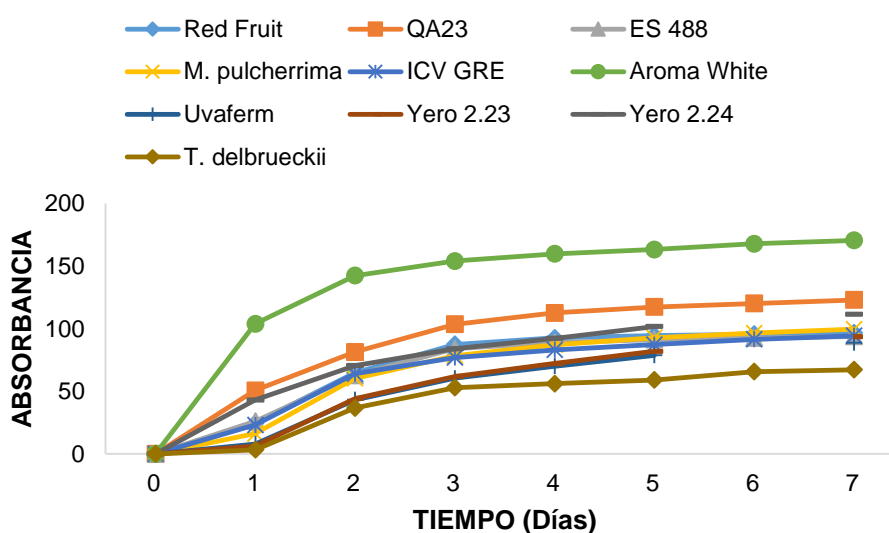


Figura 23. Evolución de la liberación de CO₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica

4.2 INFLUENCIA DE LA CEPA DE LEVADURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIROSOLO

Se realizaron 10 fermentaciones (por triplicado) en mosto sintético con 10 cepas de levaduras diferentes con el objetivo de seleccionar la cepa más productora de HT. La Figura 23 muestra el progreso de las fermentaciones seguido por las determinaciones de las pérdidas de pesos debido a la liberación de CO hasta que los pesos se mantuvieron constantes. Los resultados muestran que el HT fue producido por todas las cepas de levaduras en el mosto sintético y que se encontraba presente en el último día de fermentación (día 7; Figura 24): *T. delbrueckii* (0.25 ± 0.07 ng/mL), Yero 2.23 ($0.32 \pm$

0.01 ng/mL), *M. pulcherrima* (0.55 ± 0.03 ng/mL), Yero 2.24 (0.64 ± 0.06 ng/mL), QA23 (1.19 ± 0.04 ng/mL), Aroma White (1.31 ± 0.02 ng/mL), Uvaferm (1.36 ± 0.06 ng/mL), ICV GRE (1.44 ± 0.03 ng/mL), ES 488 (2.97 ± 0.14 ng/mL) y RF (6.12 ± 0.11 ng/mL) en el medio extracelular.

Las levaduras *S. cerevisiae* comerciales analizadas (Aroma White, Uvaferm, ICV GRE, QA23, RF y ES 488) produjeron más HT (1.19-6.12 ng/mL en el medio extracelular y 0.04-0.11 ng/mL en el medio intracelular) que las levaduras *S. cerevisiae* autóctonas analizadas (Yero 2.23 y Yero 2.24) (0.32-0.64 ng/mL en el medio extracelular y 0.10-0.14 ng/mL en el medio intracelular) y que las no *S. cerevisiae* analizadas (*T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*) (0.25-0.55 ng/mL en el medio extracelular y 0.09 ng/mL en el medio intracelular) (Figura 24).

Concretamente, la levadura que produjo mayor concentración de HT fue *S. cerevisiae* comercial RF (6.12 ng/ mL) (Figura 24). Por tanto, la cepa RF fue la seleccionada para los futuros experimentos.

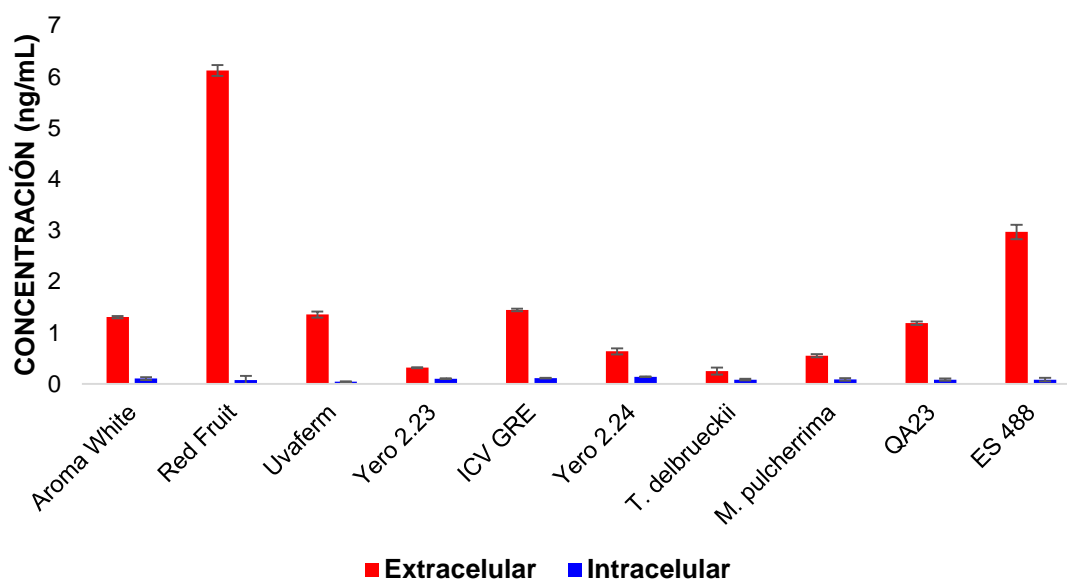


Figura 24. Producción de hidroxitirosol (ng/mL) en mosto sintético

Estos datos muestran que las diferentes cepas presentan diferentes capacidades para la síntesis de HT y su selección podría tener un impacto en la concentración final de este compuesto bioactivo.

Fernández-Cruz et al., (2017) observaron también que varias cepas de levaduras (RF, QA23, ES 488, ICE GRE, Uvaferm, *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*) demostraron

diferentes capacidades para la formación de compuestos bioactivos, en ese caso de melatonina. Específicamente, la cepa RF fue la que menos melatonina sintetizó (≈ 0.75 ng/mL), en mosto sintético, en el último día de fermentación (día 7). Respecto al resto de levaduras, ICV GRE y Uvaferm no produjeron melatonina y las restantes sintetizaron este compuesto en el siguiente orden: ES 488 (≈ 0.8 ng/mL), *M. pulcherrima* (≈ 0.9 ng/mL) y QA23 y *T. delbrueckii* (≈ 1 ng/mL). Las concentraciones de glucosa y fructosa del mosto sintético del estudio de Fernández-Cruz et al., (2017) fueron las mismas que las de esta Tesis (100 g/L de cada azúcar). Sin embargo, ambos estudios se diferencian en que las muestras de Fernández-Cruz et al., (2017) fueron fermentadas a una temperatura ligeramente superior, 28°C en lugar de 25°C, que los mostos sintéticos fueron autoclavados a 121°C durante 21 minutos en vez de esterilizados por filtrado y que los mostos fueron inoculados con 10^5 células/mL en lugar de con 10^6 células/mL.

En el estudio de Álvarez-Fernández et al., (2018) las diferentes cepas de levaduras involucradas en la FA también mostraron diferentes capacidades para la producción de HT. La levadura *T. delbrueckii* fue la mayor productora de HT (16.1 ± 2.3 ng/mL) en muestras intracelulares de mosto sintético. Otras levaduras analizadas como QA23 y RF produjeron 6 ± 2.7 ng/mL y 106.2 ± 35.1 ng/mL de HT, respectivamente (Álvarez-Fernández et al., 2018). Estas concentraciones de HT en el medio intracelular fueron superiores a las obtenidas en esta Tesis, tanto a las extracelulares como a las intracelulares. En el estudio de Álvarez-Fernández et al., (2018) el mosto sintético tenía una concentración de glucosa y fructosa iguales que las del mosto sintético elaborado en esta Tesis (100 g/L de cada azúcar), también fue esterilizado por filtrado e inoculado con 10^6 células/mL. Sin embargo, en el estudio de Álvarez-Fernández et al., (2018) las muestras intracelulares fueron recolectadas en el día 2 de una fermentación de 14-15 días mientras que en esta Tesis en el día 7 y la temperatura de fermentación fue de 28°C. Por otro lado, en vinos blancos, con la levadura Aroma White, las concentraciones fueron bastante superiores a las obtenidas en esta Tesis. Específicamente, en el día 7 fueron: Corredera (≈ 150 ng/mL), en una fermentación de 11 días; Moscatel (≈ 5 ng/mL), en una fermentación de 11 días; Chardonnay (≈ 150 ng/mL), en una fermentación de 15 días; Sauvignon blanc (≈ 240 ng/mL), en una fermentación de 13 días; Palomino Fino Tradicional (≈ 70 ng/mL) en una fermentación de 7 días y Vijiriega (≈ 140 ng/mL), en una fermentación de 10 días. Una razón de que estas concentraciones sean superiores a las nuestras puede ser por el hecho de que son en mostos naturales y no en mosto sintético como en esta Tesis, así como que la temperatura de fermentación fue de 28°C.

Nuestros resultados coinciden con los de Romboli et al., (2015) que mostraron que la producción de HT + tirosol está influenciada por las cepas de levaduras involucradas en

la FA. Concretamente, vieron que en las fermentaciones con únicamente una cepa de levadura *S. cerevisiae* se encontró una gran variabilidad de HT + tirosol (Romboli et al., 2015). La concentración de HT + tirosol en el vino Sangiovese fue de 18400 ± 3300 ng/mL, con la levadura *S. cerevisiae* Sc1, la cual fue superior a las observadas en esta Tesis Doctoral. Este hecho puede deberse a que las fermentaciones fueron en mostos naturales y no en sintéticos. Además, en el estudio de Romboli et al., (2015) la fermentación duró 14 días y la temperatura de fermentación fue de 28°C. Por otro lado, la levadura *C. zemplinina* en una inoculación secuencial influyó negativamente en la acumulación de estos alcoholes superiores.

De acuerdo con González et al., (2018) en general, las levaduras no *Saccharomyces* sintetizan menores cantidades de alcoholes aromáticos en comparación con las levaduras *S. cerevisiae*, existiendo una gran variabilidad entre las cepas (Romano et al., 1992); (Zironi et al., 1993). Concretamente, en el estudio de González et al., (2018) en el mosto sintético con una concentración de glucosa y de fructosa de 100 g/L de cada azúcar, las concentraciones de tirosol fueron superiores a las obtenidas en esta Tesis. Concretamente fueron las siguientes: $\approx 5526.56-6908.2$ ng/mL (QA23), $\approx 1381.64-2072.46$ ng/mL (*H. uvarum* Hu4), ≈ 552.656 ng/mL (*S. bacillaris* Cz4), $\approx 690.82-1381.64$ ng/mL (*M. pulcherrima*) y $\approx 1381.64-1657.968$ ng/mL (*T. delbrueckii*). Algunas diferencias de ambos estudios son que, en el estudio de González et al., (2018) la temperatura de fermentación fue de 28°C, la fermentación duró solo 2 días y la inoculación fue de 2×10^6 células/mL. Por otro lado, al igual que en nuestros resultados, la levadura *S. cerevisiae* (QA23) produjo más tirosol que las no *S. cerevisiae* (*H. uvarum*, *S. bacillaris*, *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*) (González et al., 2018).

CAPÍTULO 2

Una vez seleccionada la cepa de levadura más productora de HT, la RF, se analizó la producción de este compuesto en dos mostos sintéticos con diferentes concentraciones iniciales de tirosina (10 y 60 mg/L) con el objetivo de evaluar si a mayor concentración de tirosina la levadura es capaz de sintetizar más HT. También se realizó un seguimiento del consumo de tirosina.

4.3 MONITORIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

4.3.1. DENSIDAD ÓPTICA

El mosto sintético se elaboró con los mismos reactivos que el mosto sintético del *Capítulo 1* (basado en Riou et al., (1997) con algunas modificaciones), con las siguientes modificaciones: el único aminoácido fue la tirosina (10 mg/L y 60 mg/L), la concentración de YAN fue de 140 mg/L y el resto del YAN lo aportó el sulfato de amonio (3.28 g/L en el mosto sintético bajo en tirosina y 3.19 g/L en el mosto sintético alto en tirosina). Los valores de tirosina seleccionados para las fermentaciones en mosto sintético son similares a aquellos descritos en la bibliografía para mostos naturales de diferentes variedades de uva.

El seguimiento de las fermentaciones se llevó a cabo a través de la medición de la DO para determinar la velocidad de crecimiento de la cepa, en este caso, la RF (Figura 25). También se realizó mediante el desprendimiento de CO₂ (Anexo, Figura 45).

La absorbancia aumentó desde el inicio de la fermentación (día 1), luego se mantuvo más o menos constante a mitad (días 4-6) y finalmente disminuyó al final de la fermentación (días 8-10) (Figura 25).

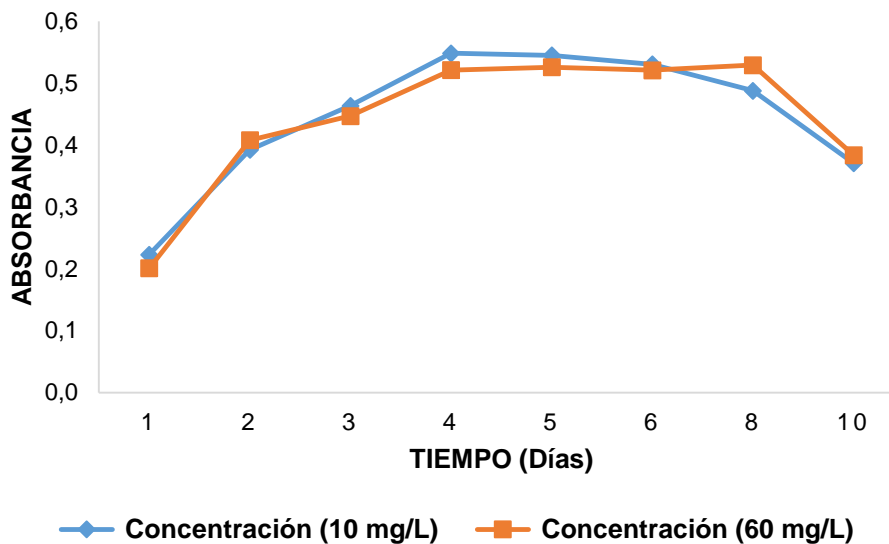


Figura 25. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

4.3.2. AZÚCARES RESIDUALES, ETANOL Y NITRÓGENO PRIMARIO

Las fermentaciones fueron también monitorizadas a través del consumo de azúcares residuales (glucosa y fructosa) (Figura 26), la producción de etanol (Figura 27) y el consumo de nitrógeno (Figura 28), por la levadura RF.

La concentración de azúcares residuales (glucosa y fructosa) fue disminuyendo progresivamente a lo largo de la fermentación, siendo totalmente consumidos al final (día 10) (Figura 26).

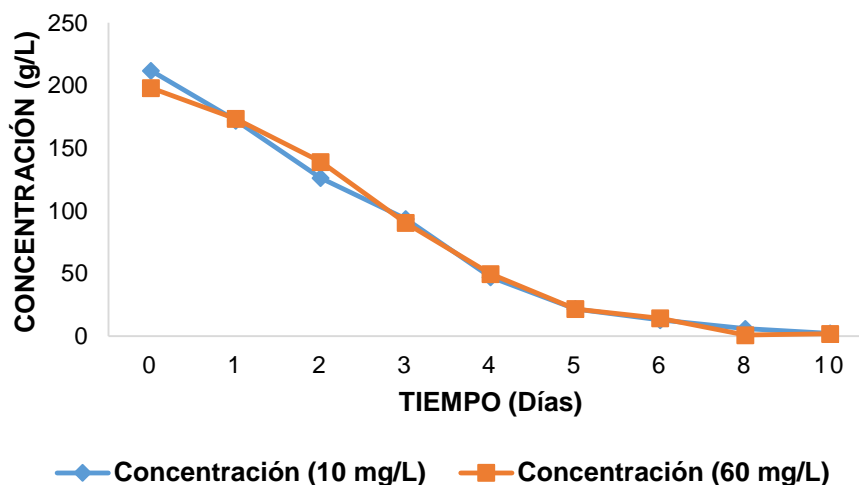


Figura 26. Evolución de la concentración de azúcares residuales (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

La producción de etanol aumentó hasta mitad de fermentación (días 3-4) y a partir de ese momento tuvo lugar una disminución notable hasta el día siguiente (días 4-5). Finalmente, a partir de estos días, en el caso del mosto sintético con una concentración inicial de 10 mg/L, aumentó ligeramente y en el caso del mosto sintético con una concentración inicial de 60 mg/L se mantuvo constante hasta el final de la fermentación (día 10) (Figura 27).

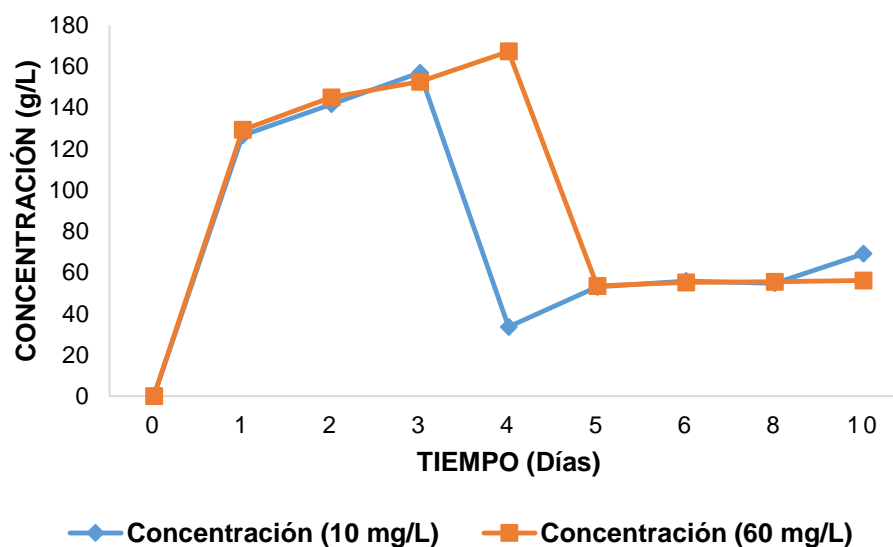


Figura 27. Evolución de la concentración de etanol (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

El nitrógeno fue prácticamente consumido en el día 0 de fermentación debido a una disminución brusca en su concentración, luego se mantuvo prácticamente constante hasta el final de la fermentación (día 8) aumentando ligeramente en el último día (día 10) (Figura 28).

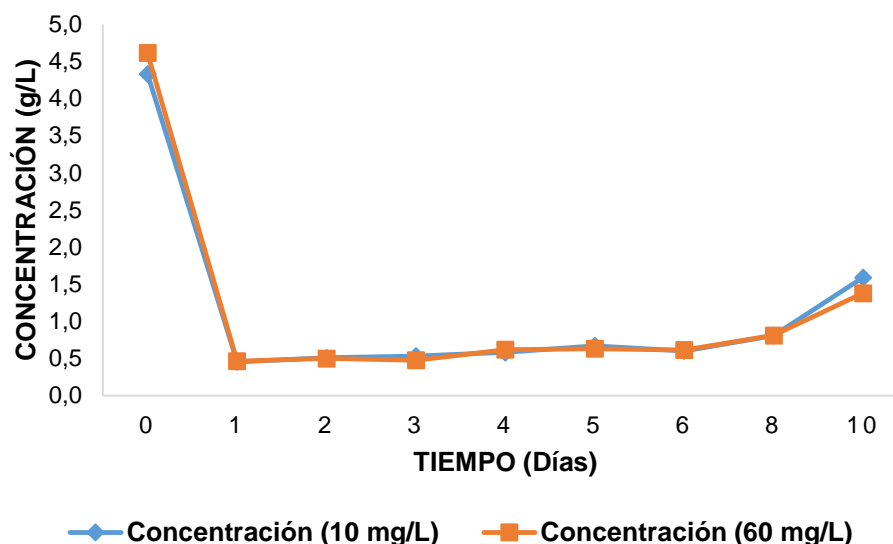


Figura 28. Evolución de la concentración de nitrógeno primario (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

Es importante que las levaduras tengan nitrógeno disponible para llevar a cabo la fermentación (Crepin et al., 2012). Concretamente, 140 mg/L es la concentración mínima de nitrógeno disponible para las levaduras necesaria para la fermentación (Vendramini et al., 2017). Si el nitrógeno disponible es insuficiente, la fermentación se vuelve más lenta y hay un alto riesgo de que se pare (Bell & Henschke, 2005). Por lo tanto, 140 mg/L fue la concentración de nitrógeno disponible para las levaduras en el mosto sintético con el fin de forzar a la levadura a usar la tirosina, una fuente no preferida.

4.4 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE TIROSINA EN EL MOSTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIROSO

En el día 0 de la FA el HT está ausente tal como se esperaba y fue detectado desde el primer día de la FA en cada muestra (Figura 29).

En el mosto sintético con una concentración inicial de tirosina de 10 mg/L, el HT estuvo presente desde el primer día y no existen diferencias significativas desde el día 2 y los días posteriores (Figura 29).

Sin embargo, en el mosto sintético con una concentración inicial de tirosina de 60 mg/L la mayor concentración de HT apareció en el día 3, disminuyendo levemente en los días posteriores (Figura 29).

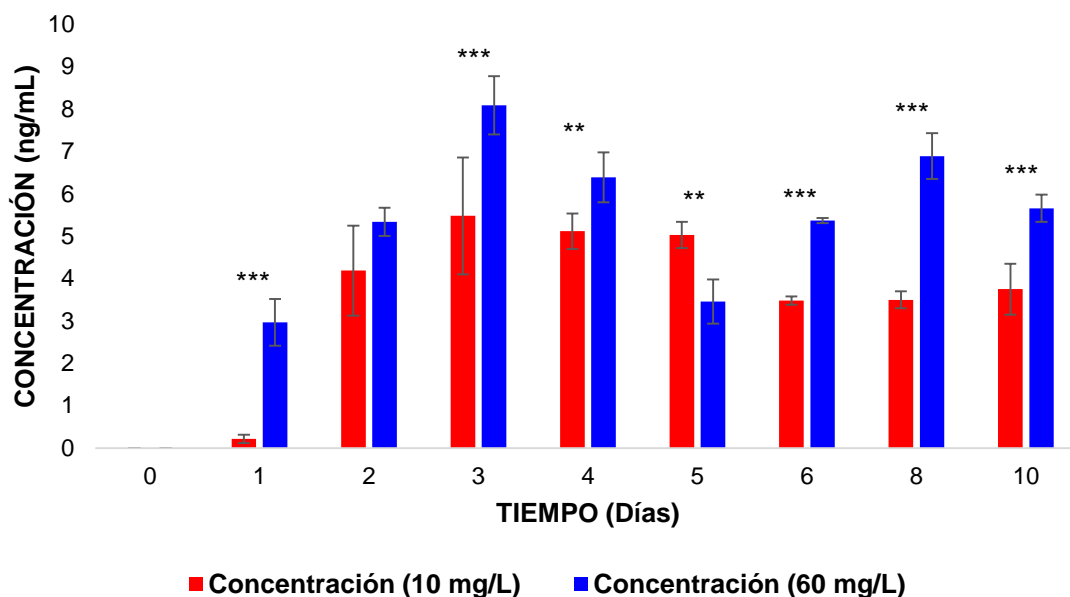


Figura 29. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina. Diferencias significativas entre las dos concentraciones de tirosina, con $p < 0.05$ son mostradas con *, $p < 0.01$ con ** y $p < 0.001$ con ***

El tirosol se forma a partir de la tirosina por la ruta de Ehrlich (Mas et al., 2014). Una hidroxilación posterior del tirosol da lugar a la síntesis de HT (Muñiz-Calvo et al., 2020). Por lo tanto, la hipótesis fue que, a mayor concentración de tirosina en el medio, mayor contenido de HT producido. Sin embargo, a pesar de que la concentración de tirosina fue seis veces superior, el HT no fue producido en esa proporción. Por ejemplo, en el día 3 de fermentación, la concentración de HT del mosto con una concentración inicial de 10 mg/L de tirosina fue de 5.48 ng/mL. En el mosto con una concentración inicial de tirosina de 60 mg/L la concentración de HT debería haber sido 6 veces superior, es decir, 32.88 ng/mL, no obstante, esta fue de 8.09 ng/mL (1.48 veces más concentrado).

La concentración de tirosina inicial no parece tener un papel decisivo en la producción de HT. Por lo tanto, podría haber otros factores o rutas metabólicas involucradas en la producción de HT.

Lo mismo ocurrió en otros estudios donde el aumento en el aminoácido precursor (fenilalanina, triptófano y tirosina) aumentó la producción de sus alcoholes resultantes (feniltanol, triptofol y tirosol), sin embargo, estos incrementos no fueron proporcionales a los aumentos en los precursores (González et al., 2018); (Ghosh et al., 2008) (Gori et al., 2011).

Para confirmar que la levadura sintetiza HT, fue analizado en el medio intracelular. Las concentraciones fueron inferiores en el medio intracelular que en el compartimento extracelular. Las mayores concentraciones detectadas en el medio intracelular fueron en los días 6 (2.74 ng/mL) y 5 (0.65 ng/mL) cuando el mosto tuvo 10 mg/L y 60 mg/ de concentración de tirosina, respectivamente (Figura 30).

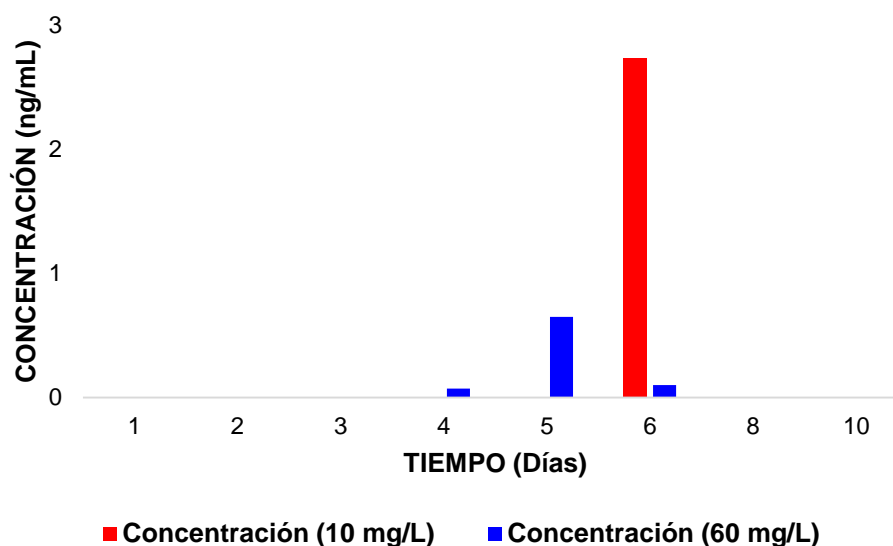


Figura 30. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio intracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

Álvarez-Fernández et al., (2018) demostraron que la levadura (*S. cerevisiae* QA23 y RF y *T. delbruecki* Biodiva) puede sintetizar HT ya que fue detectado en el medio intracelular.

Las levaduras *S. cerevisiae* usan NH_4 como fuente de nitrógeno preferida. Sin embargo, en condiciones en las que este compuesto está restringido, las levaduras pueden usar otras fuentes como los aminoácidos (Mas et al., 2014b).

La naturaleza y composición del medio (mosto de uva sintético, mosto de uva natural, mosto de cerveza, etc.) es un factor que puede afectar a la producción de metabolitos que promueven la salud humana (Vilela, 2019).

Concretamente, es conocido que la producción de alcoholes superiores por levaduras puede estar influenciada por la composición del mosto de uva (parámetros fisicoquímicos) (Romboli et al., 2015).

Romboli et al., (2015) resaltan una clara dependencia de la acumulación de los niveles de HT + tirosol de la composición del mosto de uva.

Sin embargo, no se determinaron concentraciones intracelulares superiores al incrementar la tirosina, mostrando que la capacidad de usar la tirosina parece estar limitada.

Los presentes resultados muestran que la concentración inicial de tirosina no tiene un impacto sobre la concentración de HT. Por lo tanto, parece razonable pensar que la cepa involucrada en el proceso de elaboración del vino tiene un papel relevante.

A diferencia de la melatonina que sigue un patrón en zig-zag a lo largo de la FA, apareciendo y desapareciendo en el mosto sintético, lo cual podría reflejar un papel como molécula de señalización (Fernández-Cruz et al., 2017); (Fernández-Cruz et al., 2018) el patrón del HT es más reproducible y consistente a través de las diferentes fermentaciones. Aparece en todas las muestras y permanece casi constante desde los primeros días y a lo largo de la FA. Por lo tanto, estos datos no respaldan un papel de señalización para el HT.

4.5 EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE TIROSINA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO SINTÉTICO

La tirosina fue monitorizada durante la fermentación para verificar que la levadura la metaboliza. Como era de esperar, la tirosina disminuyó en el medio extracelular desde el día 0. En el mosto con una concentración inicial de tirosina de 10 mg/L, la levadura consumió un 99.45% de tirosina desde el día 0 hasta el segundo día de fermentación. Después, el cuarto día la tirosina podría ser determinada en cantidades notables en el compartimento extracelular (27.42 ng/mL). Por otro lado, cuando el mosto tenía 60 mg/L, la levadura consumió un 99.74% de tirosina desde el día 0 hasta el segundo día de fermentación. Después, el octavo día la producción aumentó (9.04 ng/mL) (Figura 31).

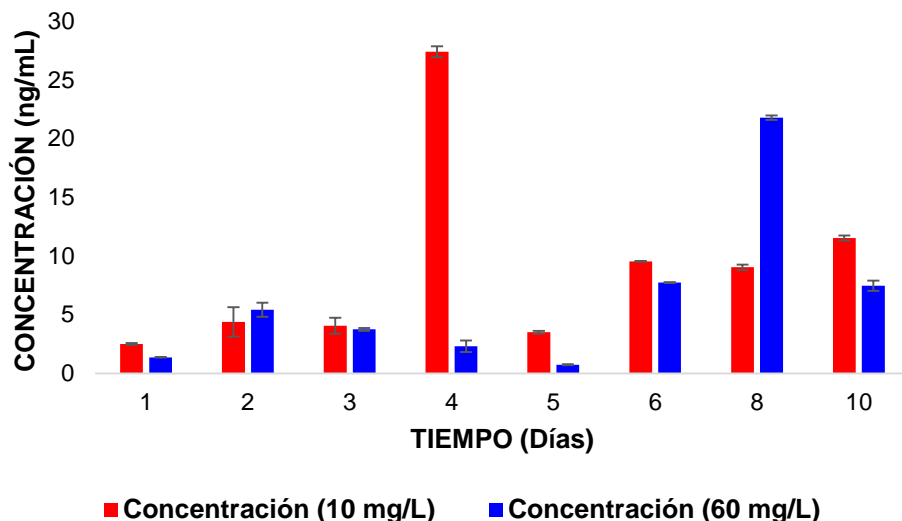


Figura 31. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

En el caso del compartimento intracelular, no existen diferencias significativas en cuanto a la concentración inicial de tirosina, a excepción del día 8. Para ambas condiciones, la concentración más alta de tirosina intracelular se midió en el día 3 (Figura 32).

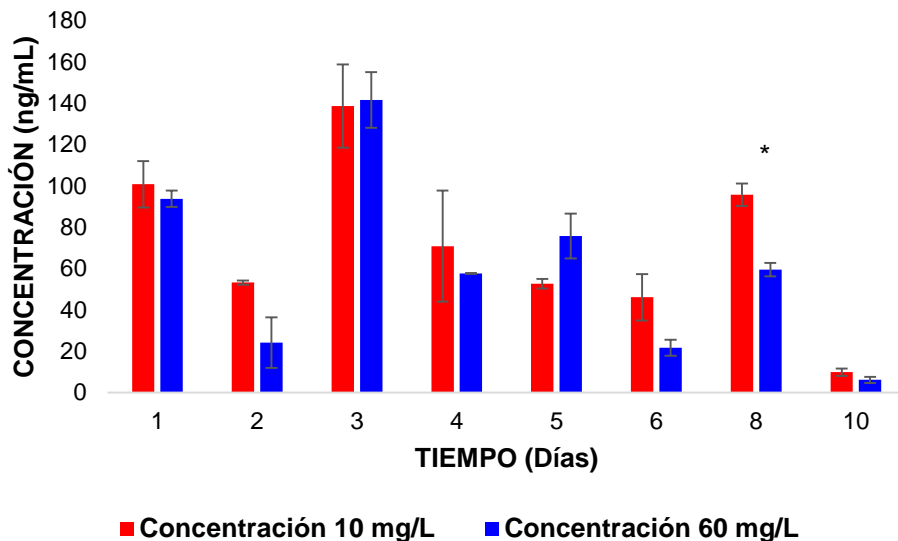


Figura 32. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio intracelular, durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina. Diferencias significativas entre las dos concentraciones de tirosina con $p < 0.05$ son mostradas con *

CAPÍTULO 3

El objetivo del *Capítulo 3* es evaluar la producción de HT en mostos de uva natural (Palomino Fino y Chardonnay) para compararla con la producción de este compuesto en mostos sintéticos. También se hizo un seguimiento del consumo de la tirosina.

4.6 MONITORIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

4.6.1. DENSIDAD ÓPTICA

El seguimiento de las fermentaciones se llevó a cabo a través de la medición de la DO para determinar la velocidad de crecimiento de la cepa, en este caso, la RF (Figura 33). También se midió el desprendimiento de CO₂ (Anexo, Figura 46).

La absorbancia aumentó levemente desde el inicio de la fermentación (día 0) hasta el día 3, luego experimentó un notable crecimiento a mitad de la fermentación (días 3-4), después en el Palomino Fino aumentó hasta el día 5 y en el Chardonnay aumentó hasta el día 6 y finalmente en ambos disminuyó hasta el final de la fermentación (día 7) (Figura 33).

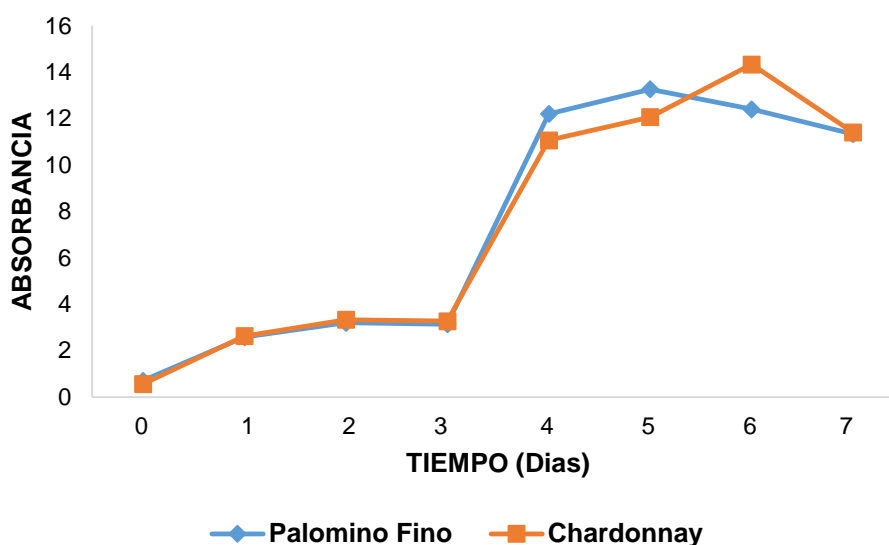


Figura 33. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay

4.7 INFLUENCIA DEL TIPO DE MOSTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIRO SOL

Los mostos de uva fueron esterilizados, a 100°C durante 10 minutos, para eliminar la carga microbiana y para garantizar que la producción de HT era debida a la cepa inoculada, la RF.

De manera similar a los experimentos con mosto sintético, la cepa RF produjo HT, excretándolo al medio extracelular durante la FA. De hecho, el HT fue detectado al comienzo de la FA en cada muestra (Figura 34).

Se observaron mayores concentraciones de HT con mostos de uva (Palomino Fino: 0.23 ± 0.15 ng/mL y 13.86 ± 1.95 ng/mL; Chardonnay: 1.25 ± 0.15 ng/mL y 27.63 ± 3.42 ng/mL) que en mostos sintéticos (6.12 ± 0.11 ng/mL) (Capítulo 1, Figura 24) y que en mostos sintéticos con 10 mg/L (0.22 ± 0.10 ng/mL y 5.48 ± 1.38 ng/mL) y 60 mg/L de tirosina (2.97 ± 0.55 ng/mL y 8.09 ± 0.69 ng/mL) (Capítulo 2, Figura 29). En concreto, las concentraciones de mostos de uva fueron de 2.6 a 4.4 veces mayores. Si se comparan ambos mostos de uva, los valores más altos fueron producidos con la variedad Chardonnay a mitad de la fermentación (días 3–4). La variedad Chardonnay dio mayores concentraciones que Palomino Fino desde el inicio de la fermentación (día 0) hasta mitad (día 4 incluido) (Figura 34).

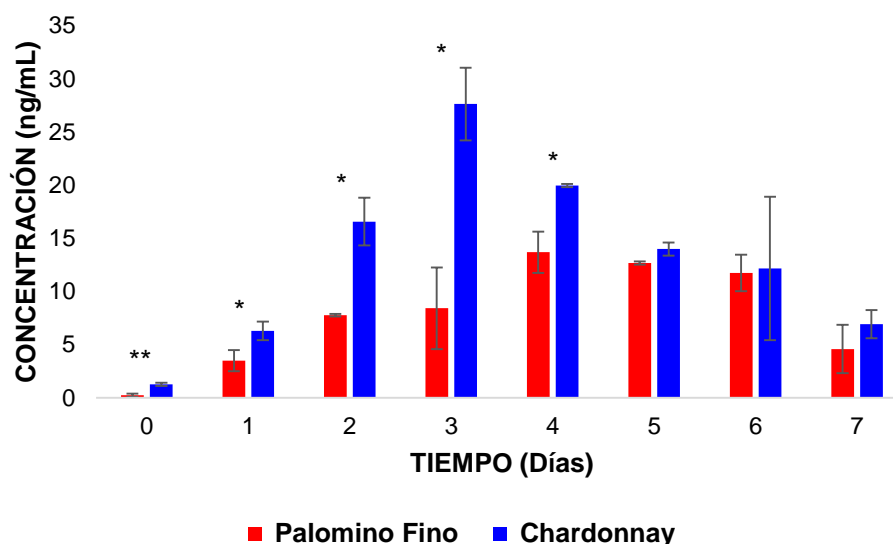


Figura 34. Evolución de la concentración de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay. Diferencias significativas con $p < 0.05$ son mostradas con * y $p < 0.01$ con **

El mosto también tiene un papel importante en la producción de HT ya que se alcanzaron mayores concentraciones de este compuesto en mostos de uva natural en comparación con el mosto sintético. Una posible explicación podría ser que las enzimas endógenas de las uvas podrían catalizar la hidroxilación de tirosol a HT (García-García et al., 2013).

Diferentes vías metabólicas, además de la hidroxilación del tirosol podrían ser posible. Por ejemplo, la escisión de macromoléculas de naturaleza polifenólica de forma similar a como el HT deriva de la oleuropeína en la aceituna, O bien que diferentes microorganismos pertenecientes a la flora autóctona de la uva formen consorcios y aumente la capacidad de producir HT.

En el estudio de Álvarez-Fernández et al. (2018), las concentraciones obtenidas en vinos blancos fueron notablemente superiores a las obtenidas en esta Tesis, tal como se observa en la tabla 26.

Tabla 26. Concentraciones de hidroxitirosol en mostos naturales Chardonnay y Palomino Fino (Álvarez-Fernández et al., 2018)

Día de fermentación	Concentración de hidroxitirosol (ng/mL)	
	Chardonnay	Palomino Fino
1	≈ 0	≈ 10
2	≈ 20	≈ 0
3	≈ 100	≈ 8
4	≈ 150	≈ 62
5	≈ 175	≈ 90
6	≈ 190	≈ 80
7	≈ 155	≈ 70

En el estudio Di Tommaso et al., (1998) también presentaron valores de HT más altos (Corvo: 1720 ± 20 ng/mL y Trebbiano d’Abruzzo: 1920 ± 40 ng/mL).

El hecho de que estas concentraciones sean superiores a las observadas en esta Tesis puede ser debido a varias razones: i) la temperatura de fermentación fue ligeramente superior (28°C) y ii) los mostos naturales no fueron esterilizados, por lo que la carga microbiana de los mismos pudo contribuir a la síntesis de HT (Álvarez-Fernández et al., 2018).

Cabe destacar que valores más bajos fueron obtenidos en esta Tesis después de la eliminación de la flora autóctona; las concentraciones más elevadas de HT de los mostos esterilizados fueron de 167 ng/mL en Chardonnay y de 89 ng/mL en Palomino

Fino, en el día 5 de fermentación en una fermentación de 15 días en el caso del Chardonnay y de 7 días en el palomino Fino (Álvarez-Fernández et al., 2018). Álvarez-Fernández et al., (2018) usaron la cepa de levadura Aroma White y la temperatura de fermentación fue de 28°C. La microflora de la uva podría ser la responsable de la diferencia entre los valores registrados y aquellos obtenidos al esterilizar los mostos de uva. De hecho, la concentración de tirosina no parece ser un factor relevante, mostrando ser producida a una tasa constante. Aparentemente, la presencia de diferentes cepas podría ser más importante para lograr unas mayores cantidades.

Estudios previos indican que los valores obtenidos en mostos blancos fermentados (21.78 ng/mL como máximo) son notablemente inferiores que los determinados para los tintos, concretamente con el Tempranillo con la mayor concentración de HT en el día 2 (235 ng/mL) (Álvarez-Fernández et al., 2018). Piñeiro et al., (2011) determinaron valores de entre 280 ng/mL y 5020 ng/mL de HT en 15 variedades de vino tinto. Este hecho lleva a pensar en otras vías alternativas que implican polifenoles ya que los vinos tintos son más ricos en HT que los rosados (1.1 ± 0.4 mg/kg² y 1.2 ± 0.8 mg/kg²) y los blancos (Ragusa et al., 2017).

4.8 INFLUENCIA DEL TIPO DE MOSTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TIROSINA

Con respecto a la presencia de tirosina en el medio extracelular, las concentraciones en el mosto Palomino Fino oscilaron entre 4.31 ng/mL (día 4) y 12.20 mg/L (día 2), mientras que las concentraciones en el mosto Chardonnay oscilaron entre 3.83 ng/mL (día 1) y 21.79 ng/mL (día 2). Las concentraciones de tirosina disminuyeron brucamente del día 0 al día 1 y a lo largo de toda la fermentación fueron aumentando y disminuyendo hasta ser al final de la fermentación (día 7) similares a las del día 1 (Figura 35).

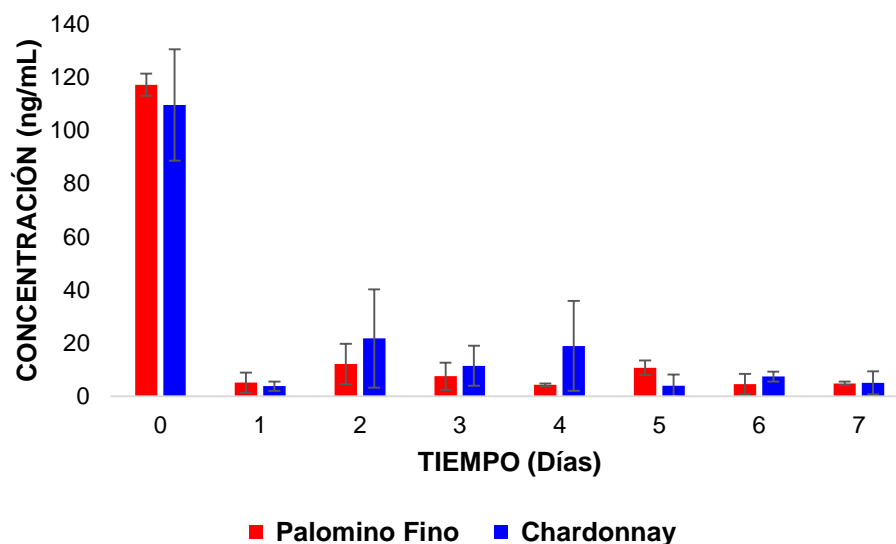


Figura 35. Evolución de la concentración de tirosina (ng/mL), en el medio extracelular, durante la fermentación alcohólica en los mostos de uva natural Palomino Fino y Chardonnay

Estos valores son similares a los obtenidos en el mosto sintético con una concentración inicial de tirosina de 10 mg/L. No hay diferencias significativas entre los mostos y tampoco entre los días, a excepción de los días 0 (Palomino Fino 117 ng/mL y Chardonnay 109 ng/mL) y 1 en ambos mostos.

CAPÍTULO 4

El *Capítulo 4* se centra en analizar la producción de HT y tirosol en mostos de uva tinta y blanca (Tempranillo, Pedro Ximénez y Palomino Fino) a dos temperaturas diferentes de fermentación (18 y 25°C) y sometidos a esterilización y sin esterilizar para evaluar un posible efecto de consorcios de diferentes levaduras.

4.9 MONITORIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

4.9.1 DESPRENDIMIENTO DE CO₂

Igualmente, el progreso de las fermentaciones fue seguido por las determinaciones de las pérdidas de pesos debido a la liberación de CO₂ hasta que los pesos se mantuvieron constantes (Figuras 36, 37 y 38) y mediante la medición de la densidad óptica (Anexo, Figuras 47, 48 y 49).

El desprendimiento de CO₂ en Pedro Ximénez, Tempranillo y Palomino Fino aumentó progresivamente desde el inicio de la fermentación (día 0) hasta mitad de fermentación (día 4 en los fermentados a 25°C y día 5 en los fermentados a 18°C), luego experimentó un notable aumento hasta dos días más tarde (días 6 y 7, respectivamente) momento a partir del cual las concentraciones se mantuvieron prácticamente estables hasta el final de la fermentación (días 8 y 9) (Figuras 36, 37 y 38).

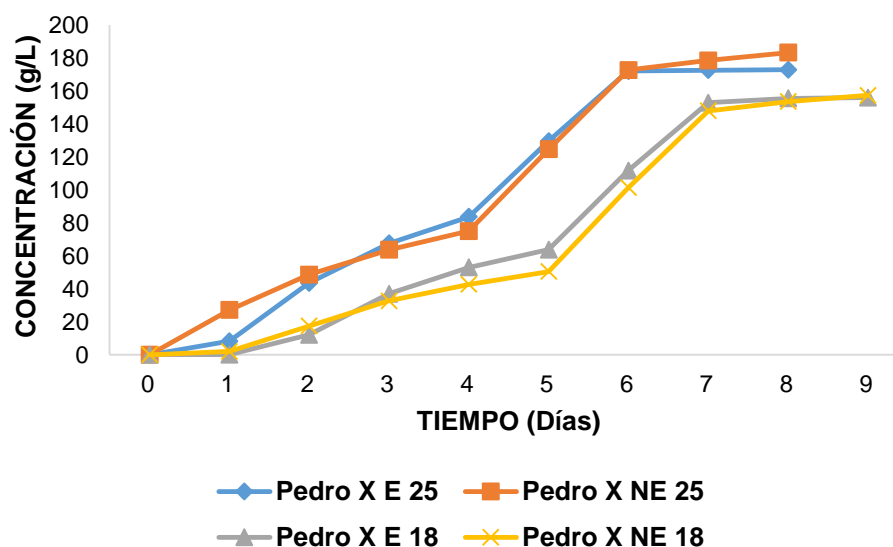


Figura 36. Evolución de la liberación de CO₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Pedro Ximénez. Pedro X: Pedro Ximénez; E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

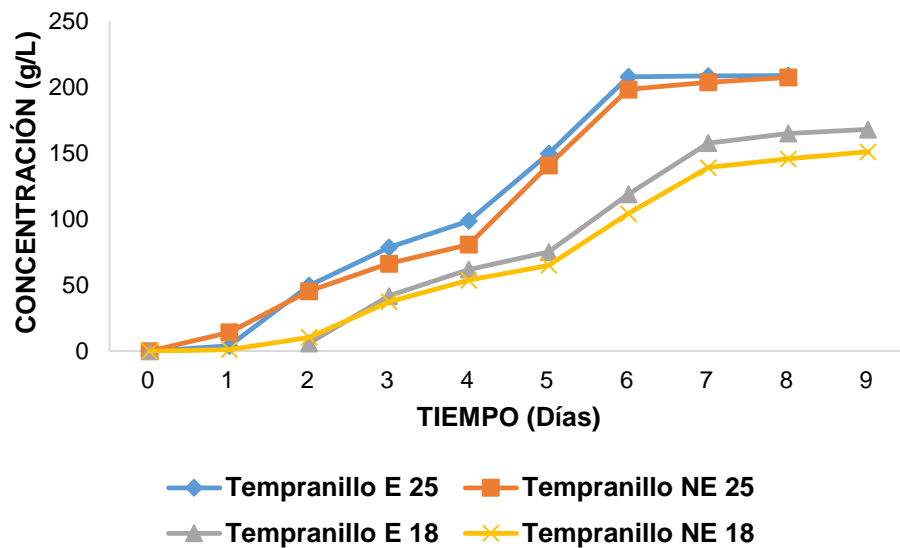


Figura 37. Evolución de la liberación de CO₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Tempranillo. E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

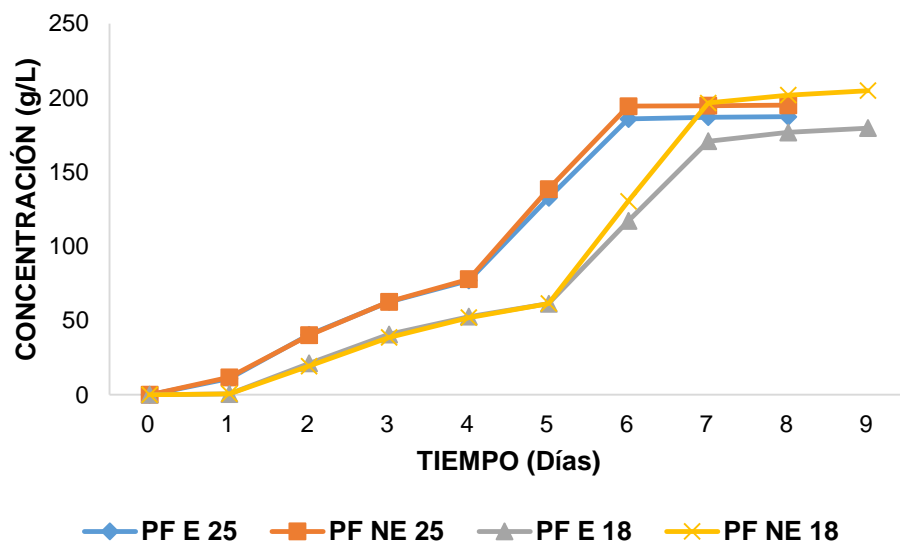


Figura 38. Evolución de la liberación de CO₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural Palomino Fino. PF: Palomino Fino; E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

4.10 INFLUENCIA DE LA ESTERILIZACIÓN DEL MOSTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIRO SOL Y TIROSOL

En el caso del mosto natural Tempranillo, las concentraciones de HT sólo presentaron diferencias significativas en las muestras de final de fermentación a 25°C, siendo mayores en las muestras no esterilizadas (Tabla 27; Figura 39).

Tabla 27. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Tempranillo

	Temperatura 18°C		Temperatura 25°C	
	Hidroxitirosol	Tirosol	Hidroxitirosol	Tirosol
Inicio	2,57 ± 0,08	0	2,57 ± 0,08	0
Mitad E	0,86 ± 0,07	74,91 ± 3,32	0,87 ± 0,17	155,89 ± 33,77 ^b
Mitad NE	0,96 ± 0,17	n.d.	1,07 ± 0,04	70,48 ± 19,68 ^b
Final E	1,93 ± 0,56	179,01 ± 47,96 ^c	1,54 ± 0,74 ^a	314,75 ± 174,07 ^d
Final NE	1,83 ± 1,01 ^e	79,57 ± 25,94 ^{c,f}	19,87 ± 3,48 ^{a,e}	7852,90 ± 789,25 ^{d,f}

Los valores principales y las desviaciones estándar están expresados en ng/mL. E: esterilizado; NE: no esterilizado; Los mismos superíndices indican diferencias significativas $p < 0.05$

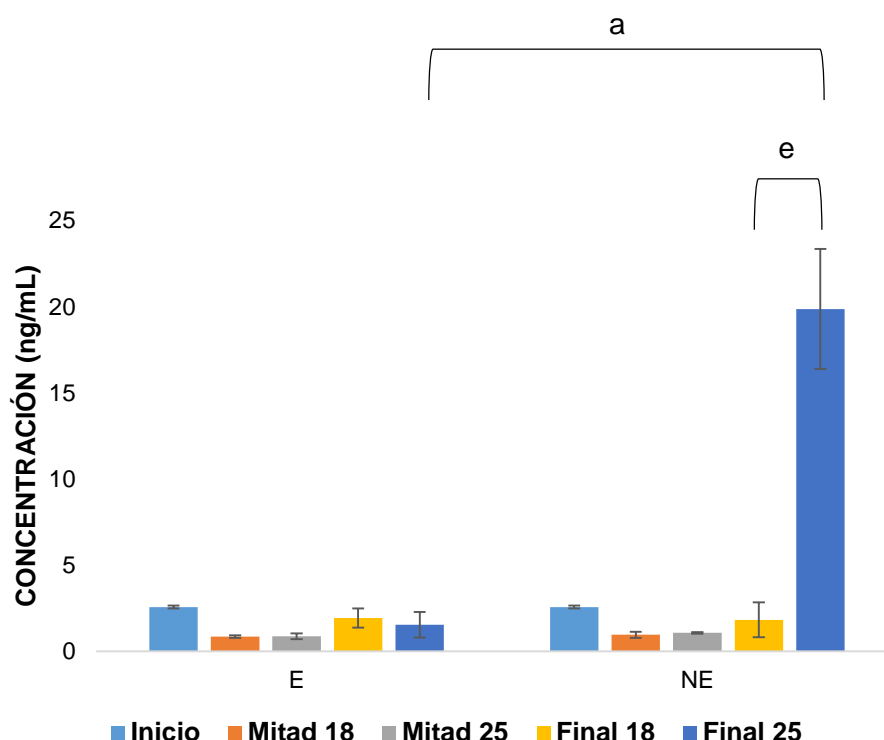


Figura 39. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Tempranillo durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas son mostradas con $p < 0.05$

En relación con la fermentación realizada con mosto de uva Palomino Fino, al igual que en el Tempranillo, todas las muestras no esterilizadas presentaron concentraciones significativamente mayores de HT en comparación con las esterilizadas. Concretamente, los valores mayores se alcanzaron al final de la fermentación (día 9) en las muestras fermentadas a 25°C (25.75 ± 2.18 ng/mL) (Tabla 28; Figura 40).

Tabla 28. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Palomino Fino

	Temperatura 18°C		Temperatura 25°C	
	Hidroxitirosol	Tirosol	Hidroxitirosol	Tirosol
Inicio	0	0	0	0
Mitad E	$0,92 \pm 0,04^a$	$4102,74 \pm 458,32^e$	$1,56 \pm 0,51^b$	$5172,29 \pm 784,33$
Mitad NE	$20,78 \pm 5,22^a$	$4700,70 \pm 342,96^e$	$11,64 \pm 2,20^b$	$6514,71 \pm 1283,99$
Final E	$0,75 \pm 0,30^c$	$5847,96 \pm 1052,46^f$	$1,17 \pm 0,33^d$	$5375,87 \pm 675,10^g$
Final NE	$15,10 \pm 0,67^{c,h}$	$8120,49 \pm 1480,75^f$	$25,75 \pm 2,18^{d,h}$	$7218,97 \pm 715,02^g$

Los valores principales y las desviaciones estándar están expresados en ng/mL. E: esterilizado; NE: no esterilizado; Los mismos superíndices indican diferencias significativas $p < 0.05$

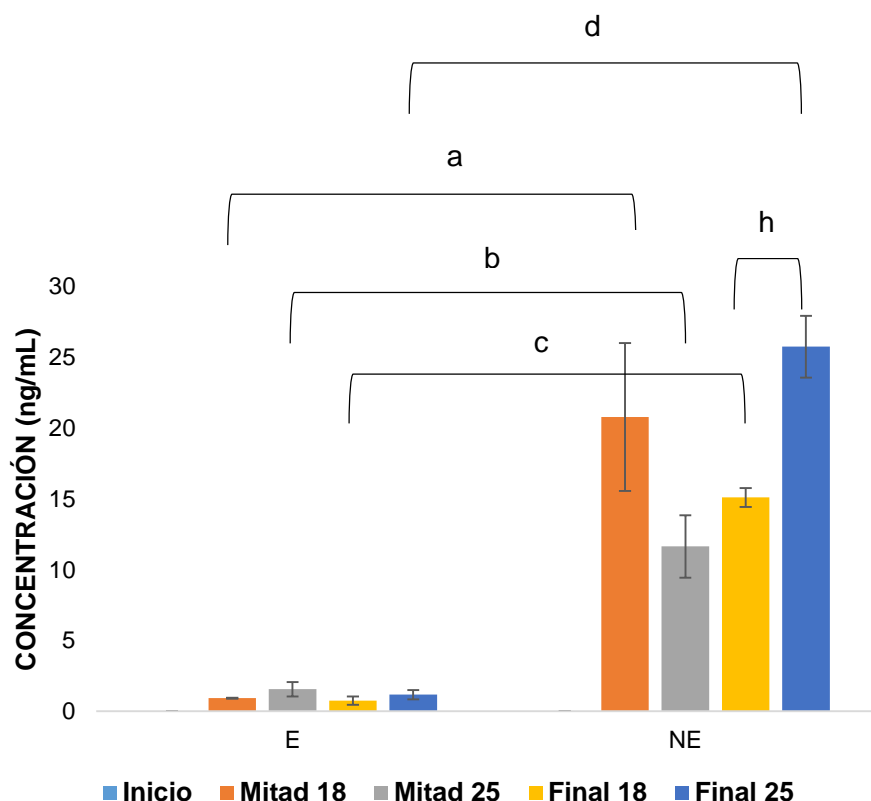


Figura 40. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Palomino Fino durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas son mostradas con $p < 0.05$

En el mosto natural Pedro Ximénez, las muestras presentaron diferencias significativas sólo al final de la fermentación a la temperatura de 18°C y a la mitad de fermentación cuando se fermentó a 25°C, siendo en todos los casos la concentración de HT mayor en las muestras no esterilizadas (Tabla 29; Figura 41).

Tabla 29. Producción de hidroxitirosol y tirosol durante la fermentación alcohólica del mosto Pedro Ximénez.

	Temperatura 18°C		Temperatura 25°C	
	Hidroxitirosol	Tirosol	Hidroxitirosol	Tirosol
Inicio	3,48 ± 0,17	0	3,48 ± 0,17	0
Mitad E	0,65 ± 0,26	n.d.	0,59 ± 0,09 ^a	131,37 ± 38,70
Mitad NE	0,77 ± 0,32	79,79 ± 2,29	2,84 ± 0,31 ^a	84,56 ± 25,37
Final E	19,35 ± 0,18 ^{b,d}	5270,35 ± 2338,46 ^f	1,06 ± 0,12 ^d	305,72 ± 20,12 ^{c,f}
Final NE	27,28 ± 0,45 ^{b,e}	2805,21 ± 477,40 ^g	2,38 ± 1,06 ^e	107,31 ± 0,40 ^{c,g}

Los valores principales y las desviaciones estándar están expresados en ng/mL. E: esterilizado; NE: no esterilizado; Los mismos superíndices indican diferencias significativas $p < 0.05$

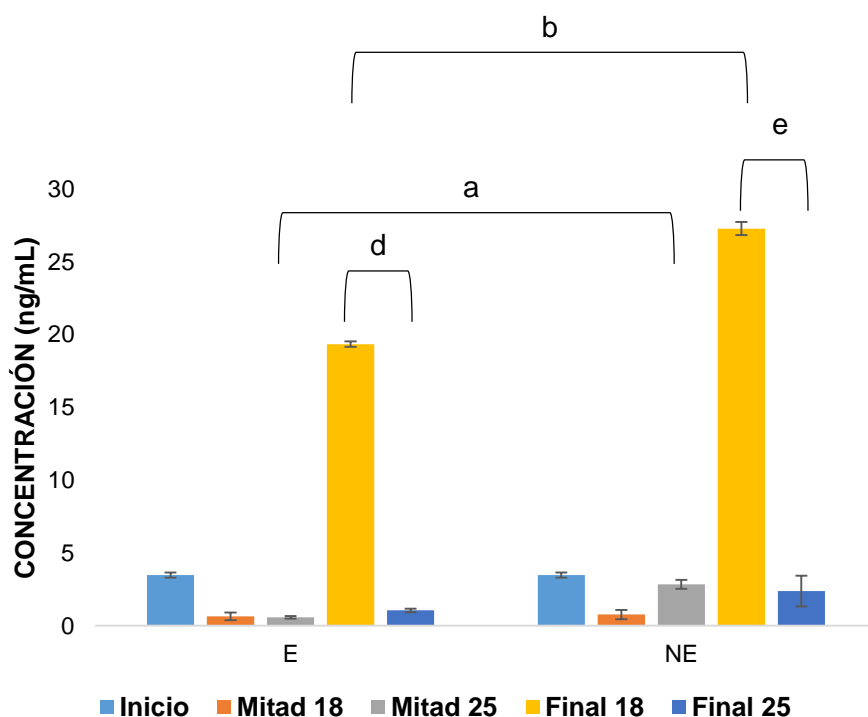


Figura 41. Producción de hidroxitirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Pedro Ximénez durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas son mostradas con $p < 0.05$

Con relación al Tempranillo, las concentraciones de tirosol fueron significativamente mayores en la muestra final no esterilizada a 25°C y en la muestra de mitad de

fermentación esterilizada a 25°C, mientras que a 18°C las mayores concentraciones de tirosol se presentaron en las muestras finales esterilizadas (Tabla 29; Figura 42).

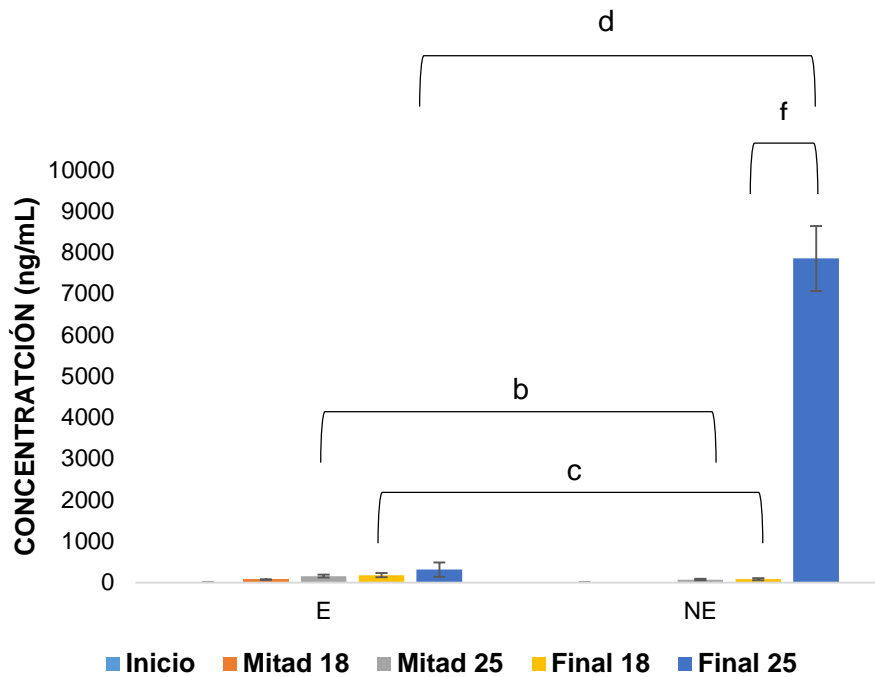


Figura 42. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Tempranillo durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas son mostradas con $p < 0.05$

En el caso de Palomino Fino, la concentración de tirosol también presentó diferencias significativas entre las muestras no esterilizadas y esterilizadas, excepto a mitad de fermentación a 25°C, dando lugar a mayores concentraciones en las no esterilizadas en todas las muestras (Tabla 28; Figura 43).

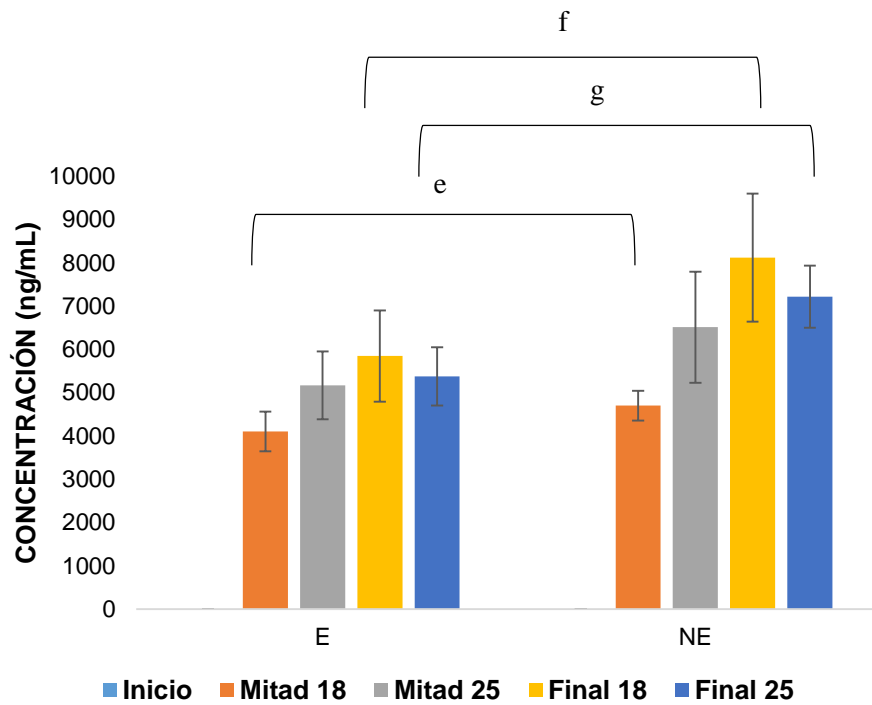


Figura 43. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Palomino Fino durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas son mostradas con $p < 0.05$

En el caso del tirosol en Pedro Ximénez, sólo presentaron diferencias significativas en las muestras de final de fermentación a 25°C, siendo mayores en las muestras esterilizadas (Tabla 29; Figura 44).

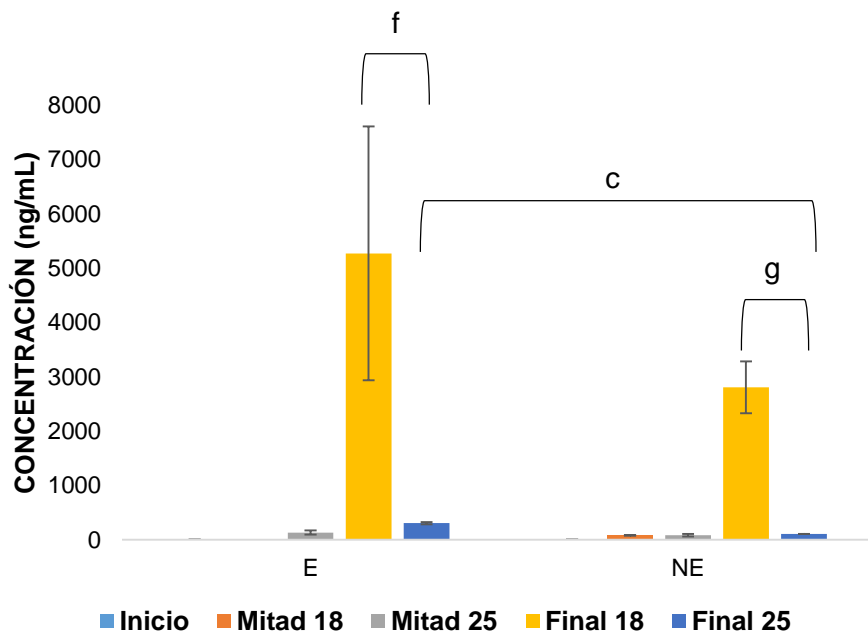


Figura 44. Producción de tirosol (ng/mL), en el medio extracelular, en el mosto de uva natural Pedro Ximénez durante la fermentación alcohólica. Diferencias significativas con $p < 0.05$ son mostradas con *, $p < 0.01$ con ** y $p < 0.001$ con ***

Respecto al factor esterilización o no de los mostos, los tres mostos de uva natural Tempranillo, Palomino Fino y Pedro Ximénez parecieron seguir una misma tendencia en la producción de HT ya que las mayores concentraciones se obtuvieron en las muestras no esterilizadas. Esto tiene sentido debido a que la carga microbiana presente en los mostos puede ser también, en parte, responsable de la producción de HT y no solo la cepa de levadura inoculada, en este caso, la RF.

Por otro lado, en los mostos Palomino y Pedro Ximénez, las mayores concentraciones de tirosol se obtuvieron en las muestras no esterilizadas mientras que en el Tempranillo en las fermentadas a 18°C en las esterilizadas y en las fermentadas a 25°C a mitad de fermentación en las esterilizadas y al final de la FA en las no esterilizadas.

4.11 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIRO SOL Y TIROSOL

En relación al mosto de uva Tempranillo, las diferencias significativas aparecieron entre las muestras no esterilizadas al final de la fermentación, siendo mayores en las fermentadas a 25°C (Tabla 27).

En el estudio de Álvarez-fernández et al., (2018) en el Tempranillo, no esterilizado, con la levadura RF, en el día 0 no se sintetizó apenas HT, en los días 5-6 las concentraciones fueron de aproximadamente 150-200 ng/mL y en los días 8-9 no se produjo HT. La máxima concentración se obtuvo en el día 3 y fue de 235 ng/mL. Estos resultados son superiores a los presentados en esta Tesis en el Tempranillo, no esterilizado, con la levadura RF. Específicamente estas concentraciones fueron de $1,07 \pm 0,04$ ng/mL en el día 5, $0,96 \pm 0,17$ ng/mL en el día 6, $19,87 \pm 3,48$ ng/mL en el día 8 y $1,83 \pm 1,01$ ng/mL en el día 9. Una diferencia es que en el estudio de Álvarez-Fernández et al., (2018) la temperatura de fermentación fue de 28°C mientras que en esta Tesis las temperaturas de fermentación fueron de 18°C y de 25°C.

En el caso de Palomino Fino, al igual que en el Tempranillo, las diferencias también fueron significativas entre las muestras no esterilizadas al final de la fermentación, siendo también superiores en aquellas fermentadas a 25°C (Tabla 28).

En contraposición con los dos mostos anteriores, en el mosto natural Pedro Ximénez, las diferencias significativas aparecieron, por un lado, entre las muestras esterilizadas al final de la fermentación y, por otro, entre las no esterilizadas al final de la fermentación.

En ambos casos las concentraciones superiores tuvieron lugar en las fermentadas a 18°C (Tabla 29).

Respecto al tirosol, en el Tempranillo, las diferencias fueron significativas en las muestras no esterilizadas al final de la FA, siendo superiores las concentraciones en las fermentadas a 25°C (Tabla 27).

En Palomino Fino, no hubo diferencias significativas en las concentraciones de tirosol entre ninguna de las muestras (Tabla 28).

En el caso del tirosol en Pedro Ximénez, las diferencias significativas tuvieron lugar, por un lado, entre las muestras esterilizadas al final de la fermentación y, por otro, entre las no esterilizadas al final de la fermentación. En ambos casos las concentraciones fueron superiores en las fermentadas a 18°C (Tabla 29).

En cuanto al factor temperatura, los mostos Palomino Fino y Tempranillo parecieron seguir una misma tendencia en la producción de HT ya que las mayores concentraciones se obtuvieron en las muestras fermentadas a 25°C al final de la fermentación. Sin embargo, en el Pedro Ximénez las mayores concentraciones se observaron al final de la fermentación en las fermentadas a 18°C.

Por otro lado, en el caso del tirosol, las mayores concentraciones en el Tempranillo aparecieron en las muestras fermentadas a 25°C al final de la FA y en el Pedro Ximénez al final de la fermentación en las fermentadas a 18°C.

La temperatura de 25°C dio lugar a mayores concentraciones de HT en los mostos Tempranillo y Palomino Fino, lo cual está de acuerdo con Bordiga et al., (2016). Estos autores observaron que el mosto de uva Monastrell que resultó en una mayor concentración de HT fue fermentado a una temperatura superior (22°C) mientras que el que dio lugar a una menor concentración a una menor temperatura (16°C). El factor temperatura afectó a todos los pasos del muestreo de manera significativa, con excepción de la mitad de la fermentación (Bordiga et al., 2016).

Sin embargo, de acuerdo con Romboli et al., (2015) las fermentaciones más lentas en mosto de uva Sangiovese dieron lugar a mayores concentraciones de HT + tirosol. En este estudio, las fermentaciones llevadas a cabo a 18°C fueron más lentas que aquellas realizadas a 25°C.

Álvarez-Fernández et al., (2018), obtuvieron concentraciones bastante superiores de HT en mostos de uva natural no esterilizados fermentados a 28°C.

5. CONCLUSIONES

1. El HT es producido por las siguientes cepas de levaduras: *S. cerevisiae* Aroma White, *S. cerevisiae* ES488, *S. cerevisiae* ICV GRE, *S. cerevisiae* QA23, *S. cerevisiae* RF, *S. cerevisiae* Uvaferm, *T. delbrueckii* Biodiva TD291, *M. pulcherrima* Flavia MP346, *S. cerevisiae* Yero 2.23 y *S. cerevisiae* Yero 2.24.
2. Las cepas de levaduras *S. cerevisiae* comerciales sintetizan mayores concentraciones de HT (1.19-6.12 ng/mL en el medio extracelular y 0.04-0.11 ng/mL en el medio intracelular) en comparación con las levaduras *S. cerevisiae* autóctonas (0.32-0.64 ng/mL en el medio extracelular y 0.10-0.14 ng/mL en el medio intracelular) y las no *S. cerevisiae* (0.25-0.55 ng/mL en el medio extracelular y 0.09 ng/mL en el medio intracelular).
3. La cepa de levadura *S. cerevisiae* RF es la mayor productora de HT de las ensayadas RF (6.12 ng/ mL) y produce este compuesto bioactivo a lo largo de toda la fermentación alcohólica.
4. La concentración inicial de tirosina no es directamente proporcional a la producción de HT ya que, aunque se incrementa seis veces la concentración inicial de tirosina en el mosto sintético, la concentración de HT no aumenta en la misma proporción.
5. El HT es cuantificado en el medio extra e intracelular siendo la concentración de éste superior en el medio extracelular que en el compartimento intracelular.
6. El mosto natural influye en la síntesis de HT, ya que es producido en mayor cantidad en los mostos de uva naturales que en los mostos sintéticos.
7. La variedad de uva influye en la producción de HT. El mosto natural que produjo una mayor concentración fue el Chardonnay comparado con el Pedro Ximénez.
8. La temperatura de fermentación influye en la producción de HT y tirosol. Sin embargo, depende también de la variedad de uva ya que en los mostos Tempranillo y Palomino fermentados a 25°C se obtienen mayores concentraciones de HT y en el mosto Tempranillo fermentado a 25°C mayores

concentraciones de tirosol. Sin embargo, en el mosto Pedro Ximénez las mayores concentraciones de HT y tirosol aparecen en el fermentado a 18°C.

9. La esterilización del mosto influye en la producción de HT ya que en los mostos no esterilizados aparecen mayores concentraciones en comparación con los esterilizados, lo que apoya la hipótesis de que los consorcios de levaduras producirían más cantidad de HT que las levaduras individuales. En el caso del tirosol depende de la variedad de uva ya que en los mostos Palomino y Pedro Ximénez, las mayores concentraciones aparecen en las muestras no esterilizadas mientras que en el Tempranillo aparecen en las esterilizadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2018). Determination of hydroxytyrosol produced by winemaking yeasts during alcoholic fermentation using a validated UHPLC–HRMS method. *Food Chemistry*, *242*, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.072>
- Álvarez-Fernández, M. A., Fernandez-Cruz, E., García Parrilla, M. C., Troncoso, A. M., Mattivi, F., Vrhovsek, U., & Arapitsas, P. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* intra- and extra-cellular aromatic amino acids metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *acs.jafc.9b01844*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01844>
- Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C., & Cos, S. (2013a). Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvascular Research*, *87*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.02.008>
- Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C., & Cos, S. (2013b). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, *54*(4), 373–380. <https://doi.org/10.1111/jpi.12007>
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. (2003). The Production of a New Tempeh-like Fermented Soybean Containing a High Level of γ -Aminobutyric Acid by Anaerobic Incubation with *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *67*(5), 1018–1023. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1018>
- Avbelj, M., Zupan, J., Kranjc, L., & Raspor, P. (2015). Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(38), 8544–8550. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03400>
- Avbelj, M., Zupan, J., & Raspor, P. (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(18), 7841–7852. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7758-3>
- Bach, B., Meudec, E., Lepoutre, J. P., Rossignol, T., Blondin, B., Dequin, S., & Camarasa, C. (2009). New insights into γ -aminobutyric acid catabolism: Evidence for γ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *saccharomyces*

- cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4231–4239.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00051-09>
- Bajic, V., & Spremo-Potparevic, B. (2011). P4-040: Hsp90 and toxic proteins in neurodegenerative disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(4S_Part_21), S711–S712.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2060>
- Barbin, G., Pollard, H., Gaiarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. (1993). Involvement of GABA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, 152(1–2), 150–154. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90505-F](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90505-F)
- Bartolomé, B., Peña-Neira, A., & Gómez-Cordovés, C. (2000). Phenolics and related substances in alcohol-free beers. *European Food Research and Technology*, 210(6), 419–423. <https://doi.org/10.1007/s002170050574>
- Behar, T. N., Li, Y. X., Tran, H. T., Ma, W., Dunlap, V., Scott, C., & Barker, J. L. (1996). GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 16(5), 1808–1818.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-05-01808.1996>
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
- Bertelli, A. A. E., Migliori, M., Panichi, V., Longoni, B., Origlia, N., Ferretti, A., ... Giovannini, L. (2002). Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 295–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02929.x>
- Bianco, C., & Defez, R. (2009). *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3097–3107.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. Lo, Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (2010). On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974.
<https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Bligh, J. (1979). The central neurology of mammalian thermoregulation. *Neuroscience*, 4(9), 1213–1236. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90153-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90153-2)
- Bonnefont-Rousselot, D., & Collin, F. (2010). Melatonin: Action as antioxidant and

- potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.008>
- Bordiga, M., Lorenzo, C., Pardo, F., Salinas, M. R., Travaglia, F., Arlorio, M., ... Garder-Cerdán, T. (2016). Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chemistry*, 197, 1038–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.112>
- Boronat, A., Soldevila-Domenech, N., Rodríguez-Morató, J., Martínez-Huélamo, M., Lamuela-Raventós, R. M., & De La Torre, R. (2020). Beer phenolic composition of simple phenols, prenylated flavonoids and alkylresorcinols. *Molecules*, 25(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules25112582>
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (1997). The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1–5. <https://doi.org/10.1104/pp.115.1.1>
- Burin, V. M., Gomes, T. M., Caliari, V., Rosier, J. P., and Bordignon Luiz, M. T. (2015). Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchem. J.* 122, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.03.011>
- Burkhardt, S., Reiter, R. J., & Tan, D. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin , N -acetyl- N² -formyl-5-methoxykynuramine , resveratrol and uric acid. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* . 33, 775–783. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00052-8)
- Caballero, B., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Huidobro-Fernández, C., Soria-Valles, C., Gonzalo-Calvo, D. De, ... Coto-Montes, A. (2008). Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*, 45(3), 302–311. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00591.x>
- Cadenas, S., & Barja, G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(11–12), 1531–1537. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00019-2)
- Cai, J., Chen, Y., Seth, S., Furukawa, S., Compans, R. W., & Jones, D. P. (2003). Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*,

34(7), 928–936. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00023-6)

- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., & Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 393–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03153.x>
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ... De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 622–629. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0>
- Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., & Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.024>
- Cattaneo, M. G., Fesce, R., & Vicentini, L. M. (1995). Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 291(2), 209–211. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(95\)90145-0](https://doi.org/10.1016/0922-4106(95)90145-0)
- Cerezo, A. B., & Hornedo-ortega, R. (2019). Anti-VEGF Signalling Mechanism in HUVECs by elatonin, Serotonin, Hydroxytyrosol and Other Bioactive Compounds. *Nutrients*. 11;11(10):2421. <https://doi: 10.3390/nu11102421>.
- Cerezo, A. B., Hornedo-Ortega, R., Álvarez-Fernández, M. A., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2017). Inhibition of VEGF-induced VEGFR-2 activation and HUVEC migration by melatonin and other bioactive indolic compounds. *Nutrients*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/nu9030249>
- Certified in conformity Mainz, 10. OIV. (2015). Treatment of Must With Glutathione. Resolution Oiv-Oeno 445, 1–2. <https://www.oiv.int/public/medias/1686/oiv-oeno-445-2015-en.pdf>
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., & Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Reports*, 7(3), 271–275. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400645>
- Cheigh, H. S., & Park, K. Y. (1994). Microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 34(2):175-203. <https://doi: 10.1080/10408399409527656>.

- Chen, H., & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development*, 20(9), 1150–1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Chernyshova, G. A., Plotnikov, M. B., Smol'yakova, V. I., Golubeva, I. V., Aliev, O. I., Tolstikova, T. G., ... Sorokina, I. V. (2007). Antiarrhythmic activity of n-tyrosol during acute myocardial ischemia and reperfusion. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143(6), 689–691. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0215-7>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Cho, S. Y., Park, M. J., Kim, K. M., Ryu, J. H., & Park, H. J. (2011). Production of high γ -aminobutyric acid (GABA) sour kimchi using lactic acid bacteria isolated from Mukeunjee kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 20(2), 403–408. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0057-y>
- Chrzanowski, G. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*—an interesting producer of bioactive plant polyphenolic metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21197343>
- Ciani, M., Ferraro, L., & Fatichenti, F. (2000). Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 698–703. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00269-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00269-6)
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.006>
- Coda, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.010>
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1885–1895. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>

- Cornford, E. M., Crane, P. D., Braun, L. D., Bocash, W. D., Nyerges, A. M., & Oldendorf, W. H. (1981). Reduction in Brain Glucose Utilization Rate after Tryptophol (3-Indole Ethanol) Treatment. *Journal of Neurochemistry*, 36(5), 1758–1765. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb00428.x>
- Cornwell, D. G., & Ma, J. (2008). Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8774–8786. <https://doi.org/10.1021/jf8015877>
- Covas, M. I., Miro-Casas, E., Fito, M., Farre-Albadalejo, M., Gimeno, E., Marrugat, J., De La Torre, R. (2003). Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drug Exp. Clin. Res.* 29, 203–206.111
- Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2012). Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8102–8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., ... Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 557–563. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03248.x>
- Cui, P., Luo, Z., Zhang, H., Su, Y., Li, A., Li, H., ... Xiu, R. (2006). Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Pineal Research*, 41(4), 358–362. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00375.x>
- Cui, P., Yu, M., Luo, Z., Dai, M., Han, J., Xiu, R., & Yang, Z. (2008). Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 44(1), 107–114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00496.x>
- Cui, P., Yu, M., Peng, X., Dong, L., & Yang, Z. (2012). Melatonin prevents human pancreatic carcinoma cell PANC-1-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration by inhibiting vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 236–243. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00933.x>
- Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2017). Different non-

- Saccharomyces yeast species stimulate nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>
- Dalmazzo, L. F. F., Santana-Lemos, B. A., Jácomo, R. H., Garcia, A. B., Rego, E. M., da Fonseca, L. M., & Falcão, R. P. (2011). Antibody-targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis in vitro in hematological malignancies. *Leukemia Research*, 35(5), 657–662. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.11.025>
- De La Torre, R., Covas, M. I., Pujadas, M. A., Fitó, M., & Farré, M. (2006). Is dopamine behind the health benefits of red wine? *European Journal of Nutrition*, 45(5), 307–310. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0596-9>
- De Stefano, D., Maiuri, M. C., Simeon, V., Grassia, G., Soscia, A., Cinelli, M. P., & Carnuccio, R. (2007). Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN- γ . *European Journal of Pharmacology*, 566(1–3), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.03.051>
- Deiana, M., Banni, S., Dessi, M.A., Corongiu, F.P., Aruoma, O.I., Bianchi, M.D.L.P., Spencer, J.P.E., Halliwell, B., Kaur, H and Aeschbach, R (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. 26(98), 762–769. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00231-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00231-7)
- Di Benedetto, R., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., ... Masella, R. (2007). Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(7), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.03.005>
- Di Tommaso, D., Calabrese, R., & Rotilio, D. (1998). Identification and quantitation of hydroxytyrosol in Italian wines. *HRC Journal of High Resolution Chromatography*, 21(10), 549–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4168\(19981001\)21:10<549::AID-JHRC549>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19981001)21:10<549::AID-JHRC549>3.0.CO;2-Z)
- Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., & Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8028–8034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211914200>

- Dizeyi, N., Bjartell, A., Nilsson, E., Hansson, J., Gadaleanu, V., Cross, N., & Abrahamsson, P. A. (2004). Expression of Serotonin Receptors and Role of Serotonin in Human Prostate Cancer Tissue and Cell Lines. *Prostate*, *59*(3), 328–336. <https://doi.org/10.1002/pros.10374>
- Dodick, D. W., & Capobianco, D. J. (2001). Treatment and management of cluster headache. *Current Pain and Headache Reports*, *5*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s11916-001-0015-0>
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Sanchez-Sanchez, J. J., Kaski, J. C., & Reiter, R. J. (2010). Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *Journal of Pineal Research*, *49*(1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00773.x>
- Dubbels, R., Reiter, R. J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., ... Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, *18*(1), 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00136.x>
- Ebinger, G., Bruyland, M., Martin, J. J., Herregodts, P., Cras, P., Michotte, Y., & Gommé, L. (1987). Distribution of biogenic amines and their catabolites in brains from patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *77*(2–3), 267–283. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90128-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90128-6)
- Erlander, M. G., & Tobin, A. J. (1991). The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: A review. *Neurochemical Research*, *16*(3), 215–226. <https://doi.org/10.1007/BF00966084>
- Espinosa Vidal E., de Morais, M. A. Jr., François, J. M., de Billerbeck, G. M. (2015). Biosynthesis of higher alcohol flavour compounds by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: impact of oxygen availability and responses to glucose pulse in minimal growth medium with leucine as sole nitrogen source. *Yeast*. *32*(1):47-56. <https://doi.org/10.1002/yea.3045>.
- Etschmann, M. M. W., Sell, D., Schrader, J. (2003). Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett* *25*:531–536. <https://doi.org/10.1023/A:1022890119847>
- Etschmann, M. M. W., & Schrader, J. (2006). An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(4), 440–

443. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0281-6>

- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, 11(4), 351–358. <https://doi.org/10.1097/00008469-200208000-00006>
- Favre, G., Peña-Neira, Á., Baldi, C., Hernández, N., Traverso, S., Gil, G., & González-Neves, G. (2014). Low molecular-weight phenols in Tannat wines made by alternative winemaking procedures. *Food Chemistry*, 158, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.173>
- Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M. A., Valero, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2016). Validation of an Analytical Method to Determine Melatonin and Compounds Related to L-Tryptophan Metabolism Using UHPLC/HRMS. *Food Analytical Methods*, 9(12), 3327–3336. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0529-z>
- Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M. A., Valero, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2017). Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. *Food Chemistry*, 217, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.020>
- Fernández-Cruz, E., Carrasco-Galán, F., Cerezo-López, A. B., Valero, E., Morcillo-Parra, M. Á., Beltran, G., ... García-Parrilla, M. C. (2020). Occurrence of melatonin and indolic compounds derived from L-tryptophan yeast metabolism in fermented wort and commercial beers. *Food Chemistry*, 331, 127192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127192>
- Fernández-Cruz, E., Cerezo, A. B., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2018). Time course of L-tryptophan metabolites when fermenting natural grape musts: effect of inoculation treatments and cultivar on the occurrence of melatonin and related indolic compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 92–100. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12369>
- Fernández-Cruz, E., González, B., Muñoz-Calvo, S., Morcillo-Parra, M. Á., Bisquert, R., Troncoso, A. M., ... Guillamón, J. M. (2019). Intracellular biosynthesis of melatonin and other indolic compounds in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts. *European Food Research and Technology*, 245(8), 1553–1560. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03257-5>
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E.

- (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 130(4), 797–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023>
- Fernández-Pachón, M. S., Medina, S., Herrero-Martín, G., Cerrillo, I., Berná, G., Escudero-López, B., ... Gil-Izquierdo, A. (2014). Alcoholic fermentation induces melatonin synthesis in orange juice. *Journal of Pineal Research*, 56(1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/jpi.12093>
- Feuillat, M. (1997). Vinification du Pinot noir en Bourgogne par macération préfermentaire à froid. *Revue des Oenologues*, 82, 29–31.
- Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: A potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93(2), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.014>
- Fracassetti, D. (2010). Investigation on cysteinyl thiol compounds from yeast affecting wine properties. *PhD Thesis*, 1–147.
- Galanakis, C. M. (2017) Chapter 1 – Introduction. Editor(s): Charis M. Galanakis. *Nutraceutical and Functional Food Components*. Academic Press, 1-14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805257-0.00001-6>
- Gañan, M., Martínez-Rodríguez, A. J., & Carrascosa, A. V. (2009). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 20(8), 739–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.012>
- García-García, M. I., Hernández-García, S., Sánchez-Ferrer, Á., & García-Carmona, F. (2013). Kinetic study of hydroxytyrosol oxidation and its related compounds by red globe grape polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 6050–6055. <https://doi.org/10.1021/jf4009422>
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Vázquez-Martín, A., Oliveras-Ferraro, C., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). A 2-D-HPLC-CE platform coupled to ESI-TOF-MS to characterize the phenolic fraction in olive oil. *Electrophoresis*, 30(15), 2688–2701. <https://doi.org/10.1002/elps.200800807>
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., & Martín-Belloso, O. (2008). Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂.

- Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), 469–476.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.05.002>
- Gawel R, Smith PA, Cicerale S, Keast R. (2018). The mouthfeel of white wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58(17):2939–2956. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1346584>
- Ghosh, S., Kebaara, B. W., Atkin, A. L., & Nickerson, K. W. (2008). Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7211–7218. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-08>
- Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B., Krzyzanowska, J., Czubacka, A., & Oleszek, W. (2010). Chapter 7 Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors edited by Dietary Phytochemicals and Human Health.
- Gilon, P., Tappaz, M., & Remacle, C. (1991). Localization of GAD-like immunoreactivity in the pancreas and stomach of the rat and mouse. *Histochemistry*, 96(4), 355–365. <https://doi.org/10.1007/BF00271357>
- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., ... Masella, R. (1999). Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL- induced injury in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 129(7), 1269–1277. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1269>
- Giovannini, L., Migliori, M., Filippi, C., Origlia, N., Panichi, V., Falchi, M., Bertelli, A.A., & Bertelli, A. (2001). Inhibitory activity of the white wine compounds, tyrosol and caffeic acid, on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release in human peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Tissue Reactions*, 24(2), 53-56.
- Girotti, L., Lago, M., Ianovsky, O., Elizari, M. V., Dini, A., Pérez Lloret, S., ... Cardinali, D. P. (2003). Low Urinary 6-Sulfatoxymelatonin Levels in Patients with Severe Congestive Heart Failure. *Endocrine*, 22(3), 245–248. <https://doi.org/10.1385/ENDO:22:3:245>
- Gomez, F. J. V., Raba, J., Cerutti, S., & Silva, M. F. (2012). Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *Journal of Pineal Research*, 52(3), 349–355. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00949.x>
- Gong D, Geng C, Jiang L, Cao J, Yoshimura H, Zhong L. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother Res*. 2009 May;23(5):646-50. <https://doi:10.1002/ptr.2686>

- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2010). Influence of nutrients addition to nonlimited-in-nitrogen must on wine volatile composition. *Journal of Food Science*, 75(4), 206–211. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01578.x>
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P. J., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2018). Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00670>
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M. Á., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2018). The production of aromatic alcohols in non-Saccharomyces wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiology*, 74, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.003>
- Gori, K., Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 11(8), 643–652. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00755.x>
- Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39(3), 533–541. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02283.x>
- Greco, O., Dachs, G. U., Tozer, G. M., & Kanthou, C. (2002). Mechanisms of cytotoxicity induced by horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid gene therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87(2), 221–232. <https://doi.org/10.1002/jcb.10292>
- Guerrini, S., Mangani, S., Romboli, Y., Luti, S., Pazzagli, L., & Granchi, L. (2018). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on health-promoting compounds in wine. *Fermentation*, 4(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020026>
- Gülçin, İ. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 871–876. <https://doi.org/10.1080/14756360701626223>
- Gutierrez-Cuesta, J., Sureda, F. X., Romeu, M., Canudas, A. M., Caballero, B., Coto-Montes, A., ... Pallàs, M. (2007). Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *Journal of Pineal Research*, 42(4), 394–402. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00433.x>

- Haldar, C., Häubler, D., & Gupta, D. (1992). Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *Journal of Pineal Research*, 12(2), 79–83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1992.tb00030.x>
- Hammond, J.R.M., (1993). Brewer's yeasts. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeast*. Yeast Technology, vol. 5. Academic Press, London. 620 pp
- Han, M., Liao, W. yan, Wu, S. mao, Gong, X., & Bai, C. (2020). Use of *Streptococcus thermophilus* for the in situ production of γ -aminobutyric acid-enriched fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 98–105. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16856>
- Hardeland, R., & Pandi-Perumal, S. R. (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition and Metabolism*, 2, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-22>
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144–150. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02154-8
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Heeren, G., Jarolim, S., Laun, P., Rinnerthaler, M., Stolze, K., Perrone, G. G., ... Breitenbach, M. (2004). The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Research*, 5(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.008>
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2891–2899. <https://doi.org/10.1021/jf011395o>
- Hoenicke, K., Simat, T. J., Steinhart, H., Köhler, H. J., & Schwab, A. (2001). Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan, and tryptophan metabolites in grape must and wine. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 49(11), 5494–5501. <https://doi.org/10.1021/jf010575v>
- Hogan, D. A. (2006). Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Current Biology*, 16(12), 457–458. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.035>
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., & Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*, 19(10), 2003–2012. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013>
- Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2018). Protective effects of hydroxytyrosol against α -synuclein toxicity on PC12 cells and fibril formation. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.059>
- Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., & Mas, A. (2016). Melatonin and other tryptophan metabolites produced by yeasts: Implications in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01565>
- Hua, D., Lin, S., Li, Y., Chen, H., Zhang, Z., Du, Y., ... Xu, P. (2010). Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation*, 28(4), 259–266. <https://doi.org/10.3109/10242422.2010.500724>
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(3), 490–495. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601555>
- Iriti, M., & Varoni, E. M. (2015). Melatonin in Mediterranean diet, a new perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2355–2359. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7051>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jacob, S., Poeggeler, B., Weishaupt, J. H., Sirén, A. L., Hardeland, R., Bähr, M., & Ehrenreich, H. (2002). Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *Journal of Pineal Research*, 33(3), 186–187.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2002.02943.x>

- Jakobs, C., Jaeken, J., & Gibson, K. M. (1993). Inherited disorders of GABA metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16(4), 704–715. <https://doi.org/10.1007/BF00711902>
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., & Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>
- Jeong, S. H., Lee, S. H., Jung, J. Y., Choi, E. J., & Jeon, C. O. (2013). Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of Kimchi. *Journal of Food Science*, 78(5), 763–769. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12095>
- Jiang, D., & Peterson, D. G. (2013). Identification of bitter compounds in whole wheat bread. *Food Chemistry*, 141(2), 1345–1353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.021>
- Jiraneek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75–83.
- Karbownik, M., Reiter, R. J., Burkhardt, S., Gitto, E., Tan, D. X., & Lewiński, A. (2001). Melatonin attenuates estradiol-induced oxidative damage to DNA: Relevance for cancer prevention. *Experimental Biology and Medicine*, 226(7), 707–712. <https://doi.org/10.1177/153537020222600718>
- Kim, D., Kim, H., Kim, K., & Roh, S. (2017). The Protective Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) on H₂O₂-Damaged Human Dental Pulp Stem Cells Is Mediated by the AKT Pathway and Involves Increased Expression of the Transcription Factor Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) and Its Downst. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8639485>
- Kim, D. S., Jeon, S. E., & Park, K. C. (2004). Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. *Cellular Signalling*, 16(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00091-3)
- Kim, S. Y., Ryu, J. S., Li, H., Park, W. J., Yun, H. Y., Baek, K. J., ... Kim, D. S. (2010). UVB-activated indole-3-acetic acid induces apoptosis of PC-3 prostate cancer cells. *Anticancer Research*, 30(11), 4607–4612.
- Kimura, M., Hayakawa, K., & Sansawa, H. (2002). Involvement of γ -aminobutyric acid

- (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 89(4), 388–394. <https://doi.org/10.1254/jjp.89.388>
- Kirschbaum, J., Meier, A., & Brückner, H. (1999). Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization with para-nitrobenzyloxycarbonyl chloride (PNZ-Cl) and reversed-phase LC. *Chromatographia*, 49, 117–124. <https://doi.org/10.1007/BF02575272>.
- Ko, C. Y., Lin, H. T. V., & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48(4), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.021>
- Kocadağlı, T., Yilmaz, C., & Gökmen, V. (2014). Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 153, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.036>
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>
- Kradolfer, P., Niederberger, P., & Hütter, R. (1982). Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of two aromatic aminotransferases. *Archives of Microbiology*, 133(3), 242–248. <https://doi.org/10.1007/BF00415010>
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113(9 SUPPL. 2), 71–88. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(01)00995-0)
- Kritzinger, E. C. (2012). Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine, 1–95.
- Kwon, K. J., Kim, J. N., Kim, M. K., Lee, J., Ignarro, L. J., Kim, H. J., ... Han, S. H. (2011). Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: A possible role in neuroprotection. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 110–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00820.x>
- Larson, J., Jessen, R. E., Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., & Manev, H.

- (2006). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neuroscience Letters*, 393(1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.09.040>
- Lass-Flörl, C., Fuchs, D., Ledochowski, M., Speth, C., Dierich, M. P., & Würzner, R. (2003). Antifungal properties of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Candida* species in vitro. *Journal of Medical Microbiology*, 52(2), 169–171. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.04987>
- Lass-Flörl, C., Wiedauer, B., Mayr, A., Kirchmair, M., Jenewein, I., Ledochowski, M., et al. (2002). Antifungal properties of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. in vitro. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 655–657. [https://doi: 10.1078/1438-4221-00174](https://doi.org/10.1078/1438-4221-00174)
- Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Lee, N. K., & Paik, H. D. (2017). Bioconversion using lactic acid bacteria: Ginsenosides, gaba, and phenolic compounds. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 869–877. <https://doi.org/10.4014/jmb.1612.12005>
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., & Glass, N. L. (2011). The social network: Deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 440–451. <https://doi.org/10.1038/nrmicro258>
- Lei H, Li H, Mo F, Zheng L, Zhao H, Zhao M. (2013). Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(20):8913-21. [https://doi: 10.1007/s00253-013-5137-x](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5137-x).
- Li, Y., Wei, G., & Chen, J. (2004). Glutathione: A review on biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(3), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1751-y>
- Linares, D. M., O’Callaghan, T. F., O’Connor, P. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2016). *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally gaba-enriched bioactive yogurt. *Frontiers in Microbiology*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01876>
- Liu, F., Ng, T. B., & Fung, M. C. (2001). Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. *Journal of Neural Transmission*, 108(4), 397–405.

<https://doi.org/10.1007/s007020170061>

- Liu, H., Sañuda-Peña, M. C., Harvey-White, J. D., Kalra, S., & Cohen, S. A. (1998). Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *Journal of Chromatography A*, *828*(1–2), 383–395. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00836-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00836-X)
- Liu, J., Leslie Morrow, A., Devaud, L., Grayson, D. R., & Lauder, J. M. (1997). GABA(A) receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, *17*(7), 2420–2428. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-07-02420.1997>
- López-Olmeda, J. F., Madrid, J. A., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2006). Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *144*(2), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.031>
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J. S., Davis, M. B. E., & Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, *15*(6), 1287–1298. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90008-X)
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* *30*(1-2):42-59. <https://doi:10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Maestroni, G. J. M., Covacci, V., & Conti, A. (1994). Hematopoietic Rescue via T-Cell-dependent, Endogenous Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Induced by the Pineal Neurohormone Melatonin in Tumor-bearing Mice. *Cancer Research*, *54*(9), 2429–2432. https://doi:10.1007/978-1-4613-0391-6_75
- Magyar, I., & Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, *28*(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.011>
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, *8*(8), 1–8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

- Maldonado, M. D., Moreno, H., & Calvo, J. R. (2009). Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition*, 28(2), 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.02.001>
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A., & Zappia, V. (1997). Biochemical and Molecular Roles of Nutrients The Protective Effect of the Olive Oil Polyphenol (3 , 4-Dihydroxyphenyl) - ethanol Counteracts Reactive Oxygen Metabolite – Induced Cytotoxicity. *The Journal of Nutrition*, 127(January 1996), 286–292.
- Martínez, J., García, S., & Alti, L. (2019). Evaluation of glutathione content in white grape varieties. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 58(21), 21–24. <https://doi.org/10.5073/vitis.2019.58.special-issue.21-24>
- Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014a). Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>
- Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014b). Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *BioMed Research International*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>
- Mayer, R. R., Cherry, J. H., & Rhodes, D. (1990). Effects of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells. *Plant Physiology*, 94(2), 796–810. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.796>
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 653–671. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.004>
- Meneses, A. (1999). A 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. R.* 23, 1111–1125. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00067-6)
- Mercolini, L., Mandrioli, R., & Raggi, M. A. (2012). Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: Measurement using a MEPS-HPLC-F method. *Journal of Pineal Research*, 53(1), 21–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00967.x>

- Mezzetti, F., de Vero, L., & Giudici, P. (2014). Evolved *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with enhanced glutathione production obtained by an evolution-based strategy. *FEMS Yeast Research*, *14*(6), 977–987. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12186>
- Milanovic, V., Ciani, M., Oro, L., & Comitini, F. (2012). *Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. *Microbial Cell Factories*, *11*, 10–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-18>
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, *82*(3), 409–416. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00590-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00590-3)
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2007). Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chemistry*, *104*(2), 814–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.043>
- Monagas, M., Suarez, R., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC/DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(2), 139–147.
- Morcillo-Parra, M. Á., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2020). Effect of several nutrients and environmental conditions on intracellular melatonin synthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, *8*(6), 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060853>
- Morcillo-Parra, M. Á., González, B., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2020). Melatonin and glycolytic protein interactions are related to yeast fermentative capacity. *Food Microbiology*, *87*, 103398. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103398>
- Morcillo-Parra, M. Á., Valera, M. J., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2019). Glycolytic proteins interact with intracellular melatonin in *saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02424>
- Moreno-González, R., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2020). Table olive polyphenols: A simultaneous determination by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1609*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460434>
- Morera, A. L., & Abreu, P. (2006). Seasonality of psychopathology and circannual

- melatonin rhythm. *Journal of Pineal Research*, 41(3), 279–283. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00365.x>
- Morshedi, D., Rezaei-Ghaleh, N., Ebrahim-Habibi, A., Ahmadian, S., & Nemat-Gorgani, M. (2007). Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives - Possible mechanism of action. *FEBS Journal*, 274(24), 6415–6425. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06158.x>
- Müller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K, Krone W. (1994). Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 203(1):416-21. <https://doi:10.1006/bbrc.1994.2198>.
- Nagamatsu, T., & Schust, D. J. (2010). The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod. Sci.* 17, 209–218. <https://doi:10.1177/1933719109349962>
- Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., & Takai, K. (2012). Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *European Journal of Neuroscience*, 35(11), 1762–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08077.x>
- Nardin, T., Roman, T., Dekker, S., Nicolini, G., Thei, F., Masina, B., & Larcher, R. (2022). Evaluation of antioxidant supplementation in must on the development and potential reduction of different compounds involved in atypical ageing of wine using HPLC-HRMS. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 154, 112639. <https://doi:10.1016/j.lwt.2021.112639>
- Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Aviñó, J., Perez, P., & Estrela, J. M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3–4), 410–418. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00213-5)
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. 1–32. <https://doi.org/10.1199/tab.0142>
- Nogués, M. R., Giralt, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez-Martos, V., Rodríguez, E., ... Mallol, J. (2006). Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 142–149. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00344.x>
- Nonogaki, K., Strack, A. M., Dallman, M. F., & Tecott, L. H. (1998). Leptin-independent

- hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nature Medicine*, 4(10), 1152–1156. <https://doi.org/10.1038/2647>
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2016). Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Archives of Microbiology*, 198(5), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1202-z>
- Oaknin-Bendahan, S., Anis, Y., Nir, I., & Zisapel, N. (1995). Effects of long-term administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat. *NeuroReport*, 6 (5):785-8. <https://doi.org/10.1097/00001756-199503270-00020>
- Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, V. U., Hill, D., Williams, C., & Radecka, I. (2015). Poly-γ-glutamic acid: Production, properties and applications. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(1), 1–17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081448-0>
- Oh, C. H., & Oh, S. H. (2004). Effects of Germinated Brown Rice Extracts with Enhanced Levels of GABA on Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 19–23. <https://doi.org/10.1089/109662004322984653>
- Olivier, J. D. A., Esquivel Franco, D. C., Waldinger, M. D., and Olivier, B. (2019). “Serotonin and sexual behavior,” in *The Serotonin System: History, Neuropharmacology, and Pathology*, eds M. Tricklebank and E. Daly (Amsterdam: Elsevier), 117–132. <https://doi:10.1016/b978-0-12-813323-1.00007-4>
- Oufkir, T., Arseneault, M., Sanderson, J. T., & Vaillancourt, C. (2010). The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta*, 31(5), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.019>
- Pakala, R., Willerson, J. T., & Benedict, C. R. (1994). Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation*, 90(4), 1919–1926. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.4.1919>
- Panel, E., & Nda, A. (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to melatonin and alleviation of subjective feelings of jet lag (ID 1953), and reduction of sleep onset latency, and improvement of sleep quality (ID 1953). *EFSA Journal*, 8(2), 1–14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1467>
- Panel, E., & Nda, A. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to melatonin and reduction of sleep onset latency (ID 1698, 1780, 4080).

EFSA Journal, 9(6), 1–16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2241>

- Panel, E., & Nda, A. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA Journal*, 9(4), 1–25. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>
- Pappolla, M. A., Sos, M., Omar, R. A., Bick, R. J., Hickson-Bick, D. L. M., Reiter, R. J., ... Robakis, N. K. (1997). Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *Journal of Neuroscience*, 17(5), 1683–1690. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-05-01683.1997>
- Park, M., Kang, K., Park, S., & Back, K. (2008). Conversion of 5-hydroxytryptophan into serotonin by tryptophan decarboxylase in plants, *Escherichia coli*, and yeast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(9), 2456–2458. <https://doi.org/10.1271/bbb.80220>
- Pasquini, J., Ceravolo, R., Qamhawi, Z., Lee, J. Y., Deuschl, G., Brooks, D. J., ... Pavese, N. (2018). Progression of tremor in early stages of Parkinson's disease: A clinical and neuroimaging study. *Brain*, 141(3), 811–821. <https://doi.org/10.1093/brain/awx376>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1–2), 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6)
- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00081-8)
- Pepys, M. B., Kelly, J. W., Lindquist, S., & Dobson, C. M. (2001). Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1406), 203–211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0766>
- Perrone, G. G., Tan, S. X., & Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1354–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
- Phipps, R. P., Stein, S. H., & Roper, R. L. (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology Today*, 12(10), 349–352.

[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90064-Z](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90064-Z)

- Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011a). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(21), 11683–11689. <https://doi.org/10.1021/jf202254t>
- Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011b). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(21), 11683–11689. <https://doi.org/10.1021/jf202254t>
- Pinillos, M. L., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Alonso-Bedate, M., & Delgado, M. J. (2001). Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology and Behavior*, *72*(5), 629–634. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00399-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00399-1)
- Plotnikov, M. B., Chernysheva, G. A., Smol'yakova, V. I., Maslov, M. Y., Cherkashina, I. V., Krysin, A. P., ... Tolstikova, T. G. (2007). Effect of n-tyrosol on blood viscosity and platelet aggregation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *143*(1), 61–63. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0017-y>
- Pohanka, M. (2011). Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: Implication and counteracting of melatonin. *Journal of Applied Biomedicine*, *9*(4), 185–196. <https://doi.org/10.2478/v10136-011-0003-6>
- Posmyk, M.M., & Janas, K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* *31*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0213-z>
- Pour Nikfardjam, M. S., & Pickering, G. J. (2008). Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: Phenolic composition. *European Food Research and Technology*, *227*(4), 1077–1083. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0822-1>
- Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A., Louche, K., Delagrangé, P., Renard, P., ... Pénicaud, L. (2003). Melatonin Reduces Body Weight Gain in Sprague Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. *Endocrinology*, *144*(12), 5347–5352. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0693>
- Prusty, R., Grisafi, P., Fink, G. R., Prusty, R., Grisafi, P., & Fink, G. R. (2004). The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*, *101*(12), 4153–4157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400659101>

- Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mazur, A., ... Coxam, V. (2008). Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(20), 9417–9422. <https://doi.org/10.1021/jf801794q>
- Racagni, G., Apud, J. A., Locatelli, V., Cocchi, D., Nistico, G., di Giorgio, R. M., & Müller, E. E. (1979). GABA of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. *Nature*, *281*, 575–578. <https://doi.org/10.1038/281575a0>
- Ragione, F. Della, Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V. Della, Pontoni, G., Racioppi, L., ... Zappia, V. (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *278*(3), 733–739. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3875>
- Ragusa, A., Centonze, C., Grasso, M., Latronico, M., Mastrangelo, P., Sparascio, F., ... Maffia, M. (2017). A Comparative Study of Phenols in Apulian Italian Wines. *Foods*, *6*(4), 24. <https://doi.org/10.3390/foods6040024>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, *1*(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rao, R. P., Hunter, A., Kashpur, O., & Normanly, J. (2010). Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*, *185*(1), 211–220. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.112854>
- Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K., & De Camilli, P. (1991). GABA and pancreatic β -cells: Colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO Journal*, *10*(5), 1275–1284. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08069.x>
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, *49*(8), 654–664. <https://doi.org/10.1007/BF01923947>
- Reiter, R. J., Paredes, S. D., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2009). Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin melatonin as an antioxidant R. J. Reiter et al. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *44*(4), 175–200. <https://doi.org/10.1080/10409230903044914>

- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. (2014). Melatonin: Exceeding expectations. *Physiology*, 29(5), 325–333. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Maldonado, M. D. (2005). Melatonin as an antioxidant: Physiology versus pharmacology. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 215–216. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00261.x>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., & Czarnocki, Z. (2007). Melatonin and its metabolites: New findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*, 54(1), 1–9. https://doi.org/10.18388/abp.2007_3264
- Rhodes, D., Handa, S., & Bressan, R. A. (1986). Metabolic Changes Associated with Adaptation of Plant Cells to Water Stress. *Plant Physiology*, 82(4), 890–903. <https://doi.org/10.1104/pp.82.4.890>
- Rodríguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, 126(4), 1608–1613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.038>
- Rodríguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Melatonin: A new bioactive compound in wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.009>
- Rodríguez-Naranjo, M. I., Ordóñez, J. L., Callejón, R. M., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2013). Melatonin is formed during winemaking at safe levels of biogenic amines. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.014>
- Rodríguez-Naranjo, M. I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. D. C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of Pineal Research*, 53(3), 219–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00990.x>
- Roleira, F. M. F., Tavares-Da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., & Zironi, R. (1992). Higher alcohol and acetic acid

- production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(2), 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x>
- Romboli, Y., Mangani, S., Buscioni, G., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2015). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(7), 1137–1145. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1863-9>
- Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1407–1426. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2319-1>
- Samson Mathews, S., Mahesh, T., Penumathsa, S. V., Debayon, P., & Maulik, N. (2008). Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9692–9698. <https://doi.org/10.1021/jf802050h>
- Sánchez-Hidalgo, M., Guerrero, J., Villegas, I., Packham, G., & de la Lastra, C. (2012). Melatonin, A Natural Programmed Cell Death Inducer in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3805–3821. <https://doi.org/10.2174/092986712801661013>
- Sanchez-Mateos, S., Alonso-Gonzalez, C., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C. M., Mediavilla, M. D., Cos, S., & Sanchez-Barcelo, E. J. (2007). Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. *Maturitas*, 58(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2007.06.006>
- Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., Mazorra-Manzano, M. Á., Hernández-Mendoza, A., González-Aguilar, G. A., ... González-Córdova, A. F. (2020). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01542-3>
- Satoh, Y., Tajima, K., Munekata, M., Keasling, J. D., & Lee, T. S. (2012). Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine, in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 979–984. <https://doi.org/10.1021/jf203256f>
- Scheer, F. A. J. L., Van Montfrans, G. A., Van Someren, E. J. W., Mairuhu, G., & Buijs, R. M. (2004). Daily Nighttime Melatonin Reduces Blood Pressure in Male Patients

- with Essential Hypertension. *Hypertension*, 43(2 1), 192–197. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000113293.15186.3b>
- Sergeev, P. V., Seifulla, R. D., Dunaev, V. G., Rudnev, Yu. M (1976). The effect of tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin, histidine and histamine on the peroxidation of lipids in hepatic mitochondrial membranes. *Biull Eksp Biol Med*. 81(2):169-71
- Siddiqui, E. J., Shabbir, M., Mikhailidis, D. P., Thompson, C. S., & Mumtaz, F. H. (2006). The Role of Serotonin (5-Hydroxytryptamine1A and 1B) Receptors in Prostate Cancer Cell Proliferation. *Journal of Urology*, 176(4), 1648–1653. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.06.087>
- Simat, T. J., Hoenicke, K., Gessner, M., & Christoph, N. (2004). 43 Metabolism of tryptophan and indole-3-acetic acid formation during vinification and its influence on the formation of 2-aminoacetophenone. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 54(54), 43–55.
- Simon, S., & Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.007>
- Sitbon, F., Östin, A., Sundberg, B., Olsson, O., & Sandberg, G. (1993). Conjugation of indole-3-acetic acid (IAA) in wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants, and identification of the main conjugates by frit-fast atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiology*, 101(1), 313–320. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.313>
- Siu, A. W., Maldonado, M., Sanchez-Hidalgo, M., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2006). Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal of Pineal Research*, 40(2), 101–109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00304.x>
- Sol, C., Jang, J. H., Riener, M. O., Moritz, W., Wild, P. J., Graf, R., & Clavien, P. A. (2010). Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*, 51(4), 1244–1254. <https://doi.org/10.1002/hep.23441>
- Soldevila-Domenech, N., Boronat, A., Mateus, J., Diaz-Pellicer, P., Matilla, I., Pérez-Otero, M., ... de la Torre, R. (2019). Generation of the Antioxidant Hydroxytyrosol from Tyrosol Present in Beer and Red Wine in a Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 11(9), 2241. <https://doi.org/10.3390/nu11092241>
- Song, C., Zhu, L., Shao, Y., & Chen, F. (2021). Enhancement of GABA content in

- Hongqu wine by optimisation of fermentation conditions using response surface methodology. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(4), 297–304. <https://doi.org/10.17221/47/2021-CJFS>
- Sonier, B., Arseneault, M., Lavigne, C., Ouellette, R. J., & Vaillancourt, C. (2006). The 5-HT_{2A} serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(4), 1053–1059. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.080>
- Sprague, G. F., & Winans, S. C. (2006). Eukaryotes learn how to count: Quorum sensing by yeast. *Genes and Development*, 20(9), 1045–1049. <https://doi.org/10.1101/gad.1432906>
- Sprenger, J., Hardeland, R., Fuhrberg, B., & Han, S. Z. (1999). Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*, 64(2), 209–213. <https://doi.org/10.1508/cytologia.64.209>
- St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpré, F., Ramassamy, C. (2011). Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Curr. Alzheimer Res*, 8, 543–551
- Steger, P. W., Sombra, L. L., Messina, G., Martinez, L. D., & Silva, M. F. (2010). Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis*, 31(13), 2242–2248. <https://doi.org/10.1002/elps.200900782>
- Straus, D. S., & Glass, C. K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Medicinal Research Reviews*, 21(3), 185–210. <https://doi.org/10.1002/med.1006>
- Sze, S. F., Ng, T. B., & Liu, W. K. (1993). Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. *Journal of Pineal Research*, 14(1), 27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1993.tb00481.x>
- Szlavko C. (1973). Tryptophol, tyrosol and phenylethanol—the aromatic higher alcohols in beer. *J Inst Brew* 79(4):283–288. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03541.x>

- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., ... Hardeland, R. (2005). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–197. <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>
- Tan, D. X., Hardeland, R., Back, K., Manchester, L. C., Alatorre-Jimenez, M. A., & Reiter, R. J. (2016). On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. *Journal of Pineal Research*, 27–40. <https://doi.org/10.1111/jpi.12336>
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., & Reiter, R. J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 577–597. <https://doi.org/10.1093/jxb/err256>
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., ... Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*, 85(3), 607–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W. B., Karbownik, M., & Calvo, J. R. (2000). Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *NeuroSignals*, 9(3–4), 137–159. <https://doi.org/10.1159/000014635>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42(1), 28–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Tan, D. X., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L. C., Hardel, R., Kim, S. J., ... Reiter, R. J. (2014). Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15858–15890. <https://doi.org/10.3390/ijms150915858>
- Teale W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Mol Cell Biol* 7:847–859. <https://doi:10.1038/nrm2020>.
- Tesnière, C., Brice, C., & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 99(17), 7025–7034. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6810-z>

- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., & Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, 29(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.014>
- Toker, L., Amar, S., Bersudsky, Y., Benjamin, J., Klein, E., & Agam, G. (2010). The biology of tryptophan depletion and mood disorders. *Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47(1), 46–55.
- Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8)
- Torres de Pinedo, A., Peñalver, P., & Morales, J. C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.026>
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98–112. <https://doi.org/10.1079/nrr200495>
- Tsai, J. S., Lin, Y. S., Pan, B. S., & Chen, T. J. (2006). Antihypertensive peptides and γ -aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, 41(6), 1282–1288. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.026>
- Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(11), 636–644. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00229-2)
- Tufariello, M., Durante, M., Veneziani, G., Taticchi, A., Servili, M., Bleve, G., & Mita, G. (2019). Patè olive cake: Possible exploitation of a by-product for food applications. *Frontiers in Nutrition*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00003>
- Uphouse, L., & Guptarak, J. (2010). Serotonin and sexual behavior. *Handb. Behav. Neurosci.* 21, 347–365. [https://doi:10.1016/S1569-7339\(10\)70089-8](https://doi:10.1016/S1569-7339(10)70089-8)
- Vale, S., & Glória, M. B. A. (1998). Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, 63(3), 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00019-3)

- Vicaud, E., Laemmel, E., & Stücker, O. (2000). Impact of serotonin on tumour growth. *Annals of Medicine*, 32(3), 187–194. <https://doi.org/10.3109/07853890008998826>
- Vigentini, I., Gardana, C., Fracassetti, D., Gabrielli, M., Foschino, R., Simonetti, P., ... Iriti, M. (2015). Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 388–396. <https://doi.org/10.1111/jpi.12223>
- Vijayalaxmi., Reiter, R. J., Herman, T. S., & Meltz, M. L. (1996). Melatonin and radioprotection from genetic damage: In vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutation Research - Genetic Toxicology*, 371(3–4), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90110-X](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90110-X)
- Vilela, A. (2019). The importance of yeasts on fermentation quality and human health-promoting compounds. *Fermentation*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020046>
- Villas-Bôas, S. G., & Bruheim, P. (2007). Cold glycerol-saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells. *Analytical Biochemistry*, 370(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.028>
- Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 60–64. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735>
- Vitalini, S., Gardana, C., Simonetti, P., Fico, G., & Iriti, M. (2013). Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 322–333. <https://doi.org/10.1111/jpi.12028>
- Vivancos, M., & Moreno, J. J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition*, 99(6), 1199–1207. <https://doi.org/10.1017/S0007114507876203>
- Wallace, W., Secor, J., & Schrader, L. E. (1984). Rapid Accumulation of γ -Aminobutyric Acid and Alanine in Soybean Leaves in Response to an Abrupt Transfer to Lower Temperature, Darkness, or Mechanical Manipulation. *Plant Physiology*, 75(1), 170–175. <https://doi.org/10.1104/pp.75.1.170>
- Wang, H., Dong, Q., Guan, A., Meng, C., Shi, X., & Guo, Y. (2011). Synergistic inhibition

- effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.006>
- Wang, Y. Q., Ye, D. Q., Zhu, B. Q., Wu, G. F., & Duan, C. Q. (2014). Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*, 163, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.064>
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Environmental Health*, 134, 489–492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988435>
- Wuster, A., & Babu, M. M. (2009). Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Molecular BioSystems*, 6(1), 134–141. <https://doi.org/10.1039/b913579k>
- Xu, Y., Jones, J. E., Kohno, D., Williams, K. W., Lee, C. E., Choi, M. J., ... Elmquist, J. K. (2008). 5-HT₂CRs Expressed by Pro-Opiomelanocortin Neurons Regulate Energy Homeostasis. *Neuron*, 60(4), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.033>
- Yilmaz, C., Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2014). Formation of melatonin and its isomer during bread dough fermentation and effect of baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), 2900–2905. <https://doi.org/10.1021/jf500294b>
- Yogeswara, I. B. A., Maneerat, S., & Haltrich, D. (2020). Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria—a key enzyme in Gaba synthesis. *Microorganisms*, 8(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121923>
- Yoshimura M, Toyoshi T, Sano A, Izumi T, Fujii T, Konishi S, et al. (2010). Antihypertensive effect of a gamma-aminobutyric acid rich tomato cultivar ‘DG03-9’ in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 58: 615-619
- Young, S. N., & Leyton, M. (2002). The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 857–865. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00670-0](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00670-0)
- Yu, Y., & Chadee, K. (1998). Prostaglandin E₂ stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *Journal of Immunology*, 161(7), 3746–3752. <http://doi.10.1002/eji.201141965>

- Zechmann, B., Liou, L. C., Koffler, B. E., Horvat, L., Tomašić, A., Fulgosi, H., & Zhang, Z. (2011). Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *11*(8), 631–642. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00753.x>
- Zhang, Q., Sun, Q., Tan, X., Zhang, S., Zeng, L., Tang, J., & Xiang, W. (2020). Characterization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing *Saccharomyces cerevisiae* and coculture with *Lactobacillus plantarum* for mulberry beverage brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *129*(4), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.10.001>
- Zhao, L., Liu, P., Guo, G., & Wang, L. (2015). Combination of cytokinin and auxin induces apoptosis, cell cycle progression arrest and blockage of the Akt pathway in HeLa cells. *Molecular Medicine Reports*, *12*(1), 719–727. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3420>
- Zhou, J. N., Liu, R. Y., Kamphorst, W., Hofman, M. A., & Swaab, D. F. (2003). Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *Journal of Pineal Research*, *35*(2), 125–130. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00065.x>
- Zhu, L., Liu, Z., Feng, Z., Hao, J., Shen, W., Li, X., ... Liu, J. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(11), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.09.006>
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., & Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, *15*(3), 235–238. <https://doi.org/10.1007/BF00128311>
- Žulj, M. M., Tomaz, I., Bandić, L. M., Puhelek, I., Korenika, A. M. J., & Jeromel, A. (2016). Influence of Different Yeast Strains on Metabolism of Tryptophan and Indole-3-Acetic Acid During Fermentation. *South African Journal of Enology & Viticulture*, *36*(1), 44–49. <https://doi.org/10.21548/36-1-935>
- Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., & Raspor, P. (2013). Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(10), 2496–2505. <https://doi.org/10.1021/jf3051363>

ANEXO

MONITORIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

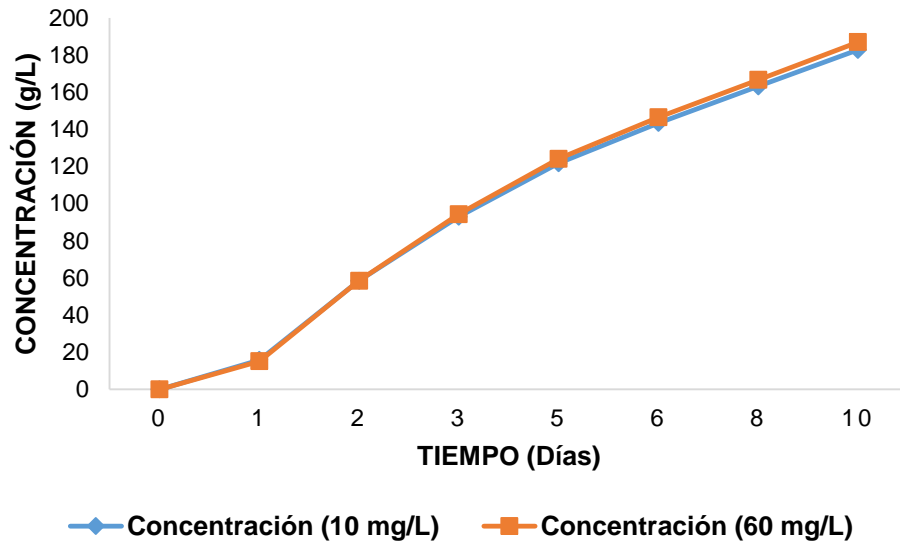


Figura 45. Evolución de la liberación de CO₂ (g/L) durante la fermentación alcohólica en mosto sintético con diferentes contenidos de tirosina

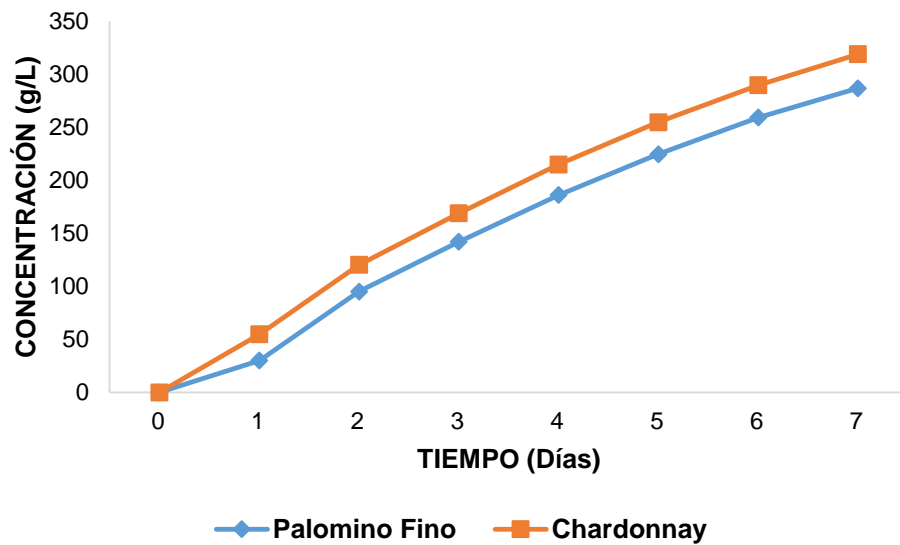


Figura 46. Evolución de la liberación de CO₂ durante la fermentación alcohólica en mostos de uva natural (Palomino Fino y Chardonnay)

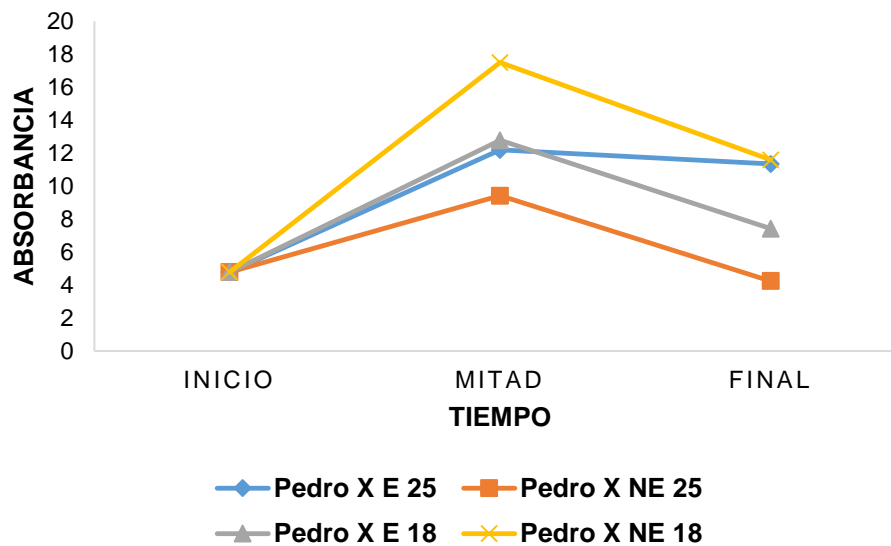


Figura 47. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural (Pedro Ximénez). Pedro X: Pedro Ximénez; E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

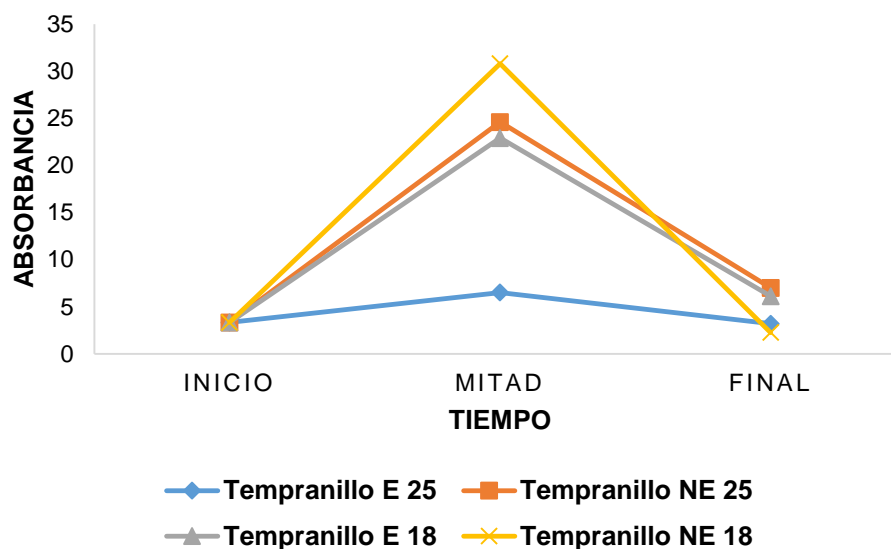


Figura 48. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural (Tempranillo). E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

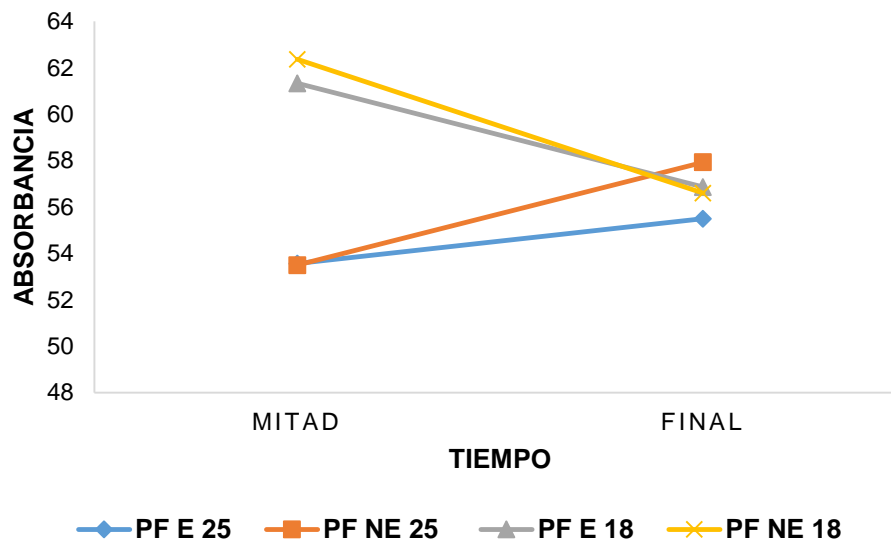


Figura 49. Evolución de la absorbancia durante la fermentación alcohólica en el mosto de uva natural (Palomino Fino). PF: Palomino Fino; E: esterilizado; NE: no esterilizado; 25: temperatura de 25°C; 18: temperatura de 18°C

Title: Factors influencing the production of the antioxidant hydroxytyrosol during alcoholic fermentation: yeast strain, initial tyrosine concentration and initial must

Inmaculada Rebollo-Romero^a, Edwin Fernández-Cruz^a, Fernando Carrasco-Galán^a, Eva Valero^b, Emma Cantos-Villar^c, Ana B. Cerezo ^a, Ana M. Troncoso^a, M. Carmen Garcia-Parrilla^{a,*}

^a Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012, Sevilla, España

^b Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Ctra. Utrera, Km 1, 41013, Sevilla, España

^c Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía, Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, España

Corresponding Author:

Professor M. Carmen Garcia-Parrilla

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

E-mail address: mcparrilla@us.es

Phone +34954556759

Fax 954233765

Este artículo está publicado en LWT (volume 130, August 2020, 109631).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109631>

1 **Title: Factors influencing the production of the antioxidant hydroxytyrosol during**
2 **alcoholic fermentation: yeast strain, initial tyrosine concentration and initial must**

3 Inmaculada Rebollo-Romero^a, Edwin Fernández-Cruz^a, Fernando Carrasco-Galán^a, Eva
4 Valero^b, Emma Cantos-Villar^c, Ana B. Cerezo ^a, Ana M. Troncoso^a, M. Carmen Garcia-
5 Parrilla^{a,*}

6 ^aDepartamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de
7 Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012, Sevilla, España

8 ^bDepartamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de
9 Olavide, Ctra. Utrera, Km 1, 41013, Sevilla, España

10 ^cInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la
11 Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía,
12 Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, España

13 Corresponding Author:

14 Professor M. Carmen Garcia-Parrilla

15 Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de
16 Farmacia, Universidad de Sevilla

17 E-mail address: mcparrilla@us.es

18 Phone +34954556759

19 Fax 954233765

20 Abbreviations: AF alcoholic fermentation; HT hydroxytyrosol; NCE Normalized Collision
21 Energy; RF Red Fruit; SM synthetic must; OD optical density; PRM Parallel Reaction
22 Monitoring; YAN Yeast Assimilable Nitrogen; YPD yeast extract peptone dextrose

23 **Abstract**

24 Hydroxytyrosol is well known for its potent antioxidant activity and anticarcinogenic,
25 antimicrobial, cardioprotective and neuroprotective properties. Main food sources are olive oil
26 (formed from the hydrolysis of oleuropein) and wine. One possible explanation to its origin in
27 wines is the synthesis from tyrosol, which in turn is produced from the Ehrlich pathway by
28 yeasts. This work aims to explore the factors that could increase the content as the strain of
29 yeast, the initial tyrosine concentrations as precursor and the effect of synthetic and sterilized
30 natural grape musts.

31 Alcoholic fermentations in synthetic must showed that. hydroxytyrosol is produced by all the
32 yeast strains under study. Commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts were those which
33 produced higher concentrations, being the Red Fruit strain the biggest producer (6.12 ng/mL).
34 Once the strain was selected, alcoholic fermentations were performed in synthetic must, with
35 different tyrosine concentrations. The amount of hydroxytyrosol did not increase in a
36 proportional way as tyrosine does. On the other hand, higher concentrations of hydroxytyrosol
37 were obtained in natural grape musts (10.46 ng/mL) than in synthetic must (4.03 ng/mL). This
38 work confirms the capacity of winemaking yeasts to produce the bioactive hydroxytyrosol.

39

40 Keywords: bioactive, tyrosine, *S. cerevisiae*, wine, alcoholic fermentation

41 1. Introduction

42 Hydroxytyrosol (HT) 2-(3,4-Dihydroxyphenyl) ethanol is a phenylethylalcohol known for its
43 bioactivity (Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012). Other
44 biological properties that have been described are: anticarcinogenic, antimicrobial,
45 cardioprotective (Yuri, Silvia, Giacomo, & Massimo, 2012) and neuroprotective (Hornedo-
46 Ortega et al., 2018). Specifically, in relation to the cardioprotection, it has antithrombotic and
47 anti-inflammatory properties (Robles-Almazan et al., 2018). In addition, HT avoids the
48 oxidation of LDL particles, it can decrease total cholesterol and it can also increase HDL
49 cholesterol (Robles-Almazan et al., 2018). Additionally, it presents a high bioavailability and
50 degree of absorption (Echeverría, Ortiz, Valenzuela, & Videla, 2017). Its degree of absorption
51 is around 99% in oil and 75% in aqueous solution since it depends on the delivery vehicle
52 (Vilaplana-Pérez, Auñón, García-Flores, & Gil-Izquierdo, 2014).

53 Extra Virgin olive oil is the main source of HT in the diet (Fernández-Mar et al., 2012). The
54 concentration of HT in extra virgin olive oil ranges between 50 mg/kg and 800 mg/kg (Carluccio
55 et al., 2003). It is formed during the hydrolysis of oleuropein which is present in olives (Robles-
56 Almazan et al., 2018). The content of HT in olive oil depends on certain factors such as the
57 variety of olive, the cultivar and origin and most importantly, the olive oil elaboration process
58 that results in the oil quality (Robles-Almazan et al., 2018). Furthermore, it has been described
59 in fermented beverages such as wine, although the concentrations are lower (Piñeiro, Cantos-
60 Villar, Palma, & Puertas, 2011; Fernandez-Mar et al., 2012). The concentration of HT in wine is
61 approximately higher than 5 mg/L (Echeverría et al., 2017). Both red and white wines contain
62 HT (Romboli, Mangani, Buscioni, Granchi, & Vincenzini, 2015). Some of the concentrations
63 found in wines were: Tempranillo 1.84 ± 1.56 mg/L; Petit Verdot 4.12 ± 0.63 mg/L and Syrah
64 1.11 ± 2.43 mg/L (Piñeiro et al., 2011); Blend 1.3 ± 0.9 mg/kg²; Chardonnay 2.3 ± 1.3 mg/kg² and
65 Fiano 1.1 ± 0.3 mg/kg² (Ragusa et al., 2017).

66 It is well known that tyrosol is produced by yeasts during alcoholic fermentation (AF) (Romboli
67 et al., 2015) through the Ehrlich pathway, which includes the transamination of tyrosine, the

68 decarboxylation of p-hydroxyphenylpyruvate and the reduction of p-hydroxyphenylaldehyde
69 (Mas et al., 2014). Some factors that have been reported to influence the AF are the pH, the
70 temperature and the nature and composition of the medium. Specifically, they can affect the
71 rate of fermentation and the production of metabolites (Vilela, 2019). Moreover, our group have
72 recently proved that certain winemaking yeasts synthesize HT (Álvarez-Fernández,
73 Fernández-Cruz, Cantos-Villar, Troncoso, & García-Parrilla, 2018) as it was unequivocally
74 determined both in the extracellular and intracellular compartments.

75 The purpose of this work is to explore the production of HT by a wider set of different
76 winemaking yeast strains, in the extracellular and intracellular compartments, in order to select
77 the one with a higher production capacity. Since there are a wide range of yeast strains used
78 for enology purpose, the main novelty of the present work is the demonstration, for the first
79 time, that certain yeast strains *S. cerevisiae* and non *S. cerevisiae*, commercial and
80 autochthonous yeasts (*S. cerevisiae* Enartis Ferm ES488, *S. cerevisiae* Lalvin ICV GRE, *S.*
81 *cerevisiae* Uvaferm, *S. cerevisiae* Yero 2.23, *S. cerevisiae* Yero 2.24, and *Metschnikowia*
82 *pulcherrima* Flavia MP 346) also produce HT. Additionally, there is a great interest on
83 increasing the concentration of these bioactive by means of the conditions on the fermentation
84 process. Since tyrosine is the precursor of HT, its initial concentration could be a key point.
85 Therefore, once the most productive yeast strain is selected, we aim to evaluate if different
86 initial tyrosine concentrations have an effect on the production of HT. As tyrosine is the
87 aromatic amino acid precursor of HT, the hypothesis of the present work is the more content
88 of tyrosine in must, the more production of HT. The last objective is to explore the capacity of
89 the selected yeast to produce HT in natural grape must to verify if the results are reproducible
90 from synthetic to natural grape musts.

91 **2. Materials and methods**

92 **2.1 Yeast strains**

93 Eight different commercial wine yeast strains, including *S. cerevisiae* and non *S. cerevisiae*,
94 were used in the fermentation of synthetic must (SM): *S. cerevisiae* Enartis Ferm Aroma White

95 (Enartis), *S. cerevisiae* Enartis Ferm ES488 (Enartis), *S. cerevisiae* Lalvin ICV GRE
96 (Lallemand), *S. cerevisiae* Lalvin YSEO QA23 (Lallemand), *S. cerevisiae* Enartis Ferm Red
97 Fruit (RF) (Enartis), *S. cerevisiae* Uvaferm (Lallemand), *Torulasporea delbrueckii* Biodiva
98 (Lallemand) and *Metschnikowia pulcherrima* Flavia MP 346 (Lallemand). Two *S. cerevisiae*
99 autochthonous yeasts, isolated from the experimental vineyard of the Rancho de la Merced
100 (IFAPA) in Jerez de la Frontera in 2016, were also tested: *S. cerevisiae* Yero 2.23 and *S.*
101 *cerevisiae* Yero 2.24.

102 **2.2 Synthetic Must**

103 SM was used in two experiments: the first one (A) aimed to screen the strain with higher
104 capacity to produce HT. The second experiment (B) was to test how different tyrosine
105 concentrations could affect the production of HT.

106 SM used for experiment A was based on Riou, Nicaud, Barre & Gaillardin (1997), slightly
107 modified. 3 L of SM were prepared, with the following composition: sugars (fructose 100 g/L
108 and glucose 100 g/L), acids (malic acid 5 g/L, citric acid 0.5 g/L and tartaric acid 3 g/L), minerals
109 (KH_2PO_4 0.75 g/L, K_2SO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, NaCl 0.2 g/L and CaCl_2 0.155 g/L),
110 0.46 g/L of NH_4Cl , 1 mL of trace elements, 13.09 mL of an amino acids solution (tyrosine 1.5
111 g/L, tryptophan 13.4 g/L, isoleucine 2.5 g/L, aspartic acid 3.4 g/L, glutamic acid 9.2 g/L, arginine
112 28.3 g/L, leucine 3.7 g/L, threonine 5.8 g/L, glycine 1.4 g/L, glutamine 38.4 g/L, alanine 11.2
113 g/L, valine 3.4 g/L, methionine 2.4 g/L, phenylalanine 2.9 g/L, serine 6 g/L, histidine 2.6 g/L,
114 lysine 1.3 g/L, cysteine 1.6 g/L and proline 46.1 g/L) and 10 mL of a vitamins solution
115 (myoinositol 2 g/L, calcium pantothenate 0.15 g/L, thiamine hydrochloride 0.025 g/L, nicotinic
116 acid 0.2 g/L, pyridoxine 0.025 g/L and biotin 3 mL). The pH was adjusted to 3.31 with NaOH.

117 5 L of two different SM were prepared for experiment B. In this case, tyrosine was the only
118 amino acid used as Yeast Assimilable Nitrogen (YAN) in order to force the yeast to use it. A
119 stock solution of this amino acid (1 g/L) was used to prepare the SM with a final tyrosine
120 concentration of 10 mg/L and 60 mg/L, respectively. The rest of the YAN was provided by
121 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to reach a final nitrogen concentration of 140 mg/L. The rest of the ingredients such

122 as sugars, acids, minerals and trace elements and vitamins solutions were identical as the SM
123 previously used for experiment A. The pH was adjusted to 3.25 with NaOH.

124 **2.3 Grape Must**

125 Palomino Fino and Chardonnay grape musts, belonged to the Rancho de la Merced (IFAPA)
126 in Jerez de la Frontera, Spain (longitude 06:00:58 W, latitude 36:45:29 N), were used in the
127 third part of the experimental process. Grapes were harvested, destemmed, crushed and
128 pressed. Subsequently, pectolytic enzymes (2.5 mL/hL Enartis ZYM; Enartis, Italy) and SO₂
129 (40 mg/L, Sulfosol, Sepsa-Enartis; Enartis) were added to the must for 24 h at 4°C. After that,
130 the dejuiced must was placed in a 100 L steel vessel.

131 **2.4 Inoculation**

132 Each yeast strain was rehydrated in a bath at 37 °C for 30 min and plated on yeast extract
133 peptone dextrose (YPD) (1% yeast extract, 2% glucose and 2% peptone). For the third
134 experiment, the YPD was prepared with the difference of the addition of 2% of agar. Then,
135 they were incubated at 28°C for 48 h. Subsequently, they were transferred into flasks with YPD
136 to let the yeasts grow overnight before every experimental process.

137 For experiment A, flasks with 80 mL of SM were inoculated with 10⁶ cells/mL and capped with
138 plugs and syringes in order to release the carbon dioxide. AF were carried out in SM in
139 triplicate. The fermentation was monitored by weighing the flasks daily, before and after
140 sampling, from the first day of fermentation until a week, as well as the optical density (OD).

141 Regarding experiment B, flasks with 750 mL of SM at different tyrosine concentrations (10
142 mg/L, 60 mg/L) were inoculated in triplicate. The fermentation was monitored by weighing the
143 flasks daily, before and after sampling, for 6 days and then at day 8 and 10 as well as the OD.

144 Ethanol (Ethanol Assay Kit, Megazyme International, Ireland), residual sugars (D-Fructose and
145 D-Glucose Assay Kit, Megazyme International, Ireland) and nitrogen (Primary Amino Nitrogen
146 Assay Kit, Megazyme International, Ireland) were measured.

147 On the other hand, grape musts were sterilized at 121°C for 20 min. Flasks with 750 mL of
148 natural grape must were inoculated. AF were carried out in two natural musts (Palomino Fino

149 and Chardonnay) in triplicate. The fermentation was monitored by weighing the flasks daily,
150 before and after sampling, from the first day of fermentation until a week, as well as the OD.

151 **2.5 Quenching and intracellular extraction**

152 Regarding experiment A, samples from the last day of fermentation (day 7) were collected in
153 tubes, once the AF was finished, in the required volume to have 10^9 cells. They were
154 centrifuged at 3500 rpm, at room temperature for 3 min. Supernatants were filtered (syringes
155 filters, cellulose acetate membrane, 0.2 μm , VWR) and they were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until the
156 analysis. On the other hand, intracellular samples were subjected to a cold glycerol solution
157 quenching according to the method conducted by Villas-Bôas and Bruheim (2007). Then,
158 intracellular metabolites were extracted following the procedure of Álvarez-Fernández et al.
159 (2019) with minor modifications. The resulting extracts were stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until samples
160 cleaning.

161 During experiment B, samples from days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 were collected.
162 Supernatants were filtered (syringes filters, nylon, 0.2 μm , VWR) and they were stored at -20
163 $^\circ\text{C}$ until sample cleaning.

164 Regarding the experiment with grape musts, samples from days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 were
165 collected. Supernatants were filtered (syringes filters, nylon, 0.2 μm , VWR) and they were
166 stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until samples cleaning.

167 **2.6 Samples treatment**

168 Extracellular samples were cleaned up using C18 SPE cartridges (Variant, Aligent) conditioned
169 with 2 mL of methanol and 2 mL of milliQ water. Then, 500 μL of sample were loaded and
170 cartridges were washed with 2 mL of a 10% v/v methanol/water solution. Analytes were eluted
171 with 1 mL of methanol. Samples were dried until total dryness, at 2000 rpm, at $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 8 h,
172 with a vacuum concentrator (HyperVAC-LITE, Gyrozen, Korea). Afterwards, samples were
173 reconstituted with 167 μL of 0.1% v/v formic acid in 10% v/v methanol/water and they were
174 stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until the analysis.

175 On the other hand, the extracts of intracellular samples were cleaned up using phospholipid
176 removal cartridges (Phree™, Phenomenex) with the purpose of removing the possible
177 impurities that could affect the analysis. Then, 100 µL of the intracellular extracts described in
178 section 2.5 were loaded. This process was repeated twice. The elution was performed
179 according to manufacturer's instructions. Then, they were dried until total dryness, at 2000
180 rpm, at 30 °C for 8 h, with a vacuum concentrator (HyperVAC-LITE, GyrozenKorea) (Álvarez-
181 Fernández et al., 2019). Afterwards, they were reconstituted with 167 µL of 0.1% v/v formic
182 acid in 10% v/v methanol/water and they were stored at -80 °C until the analysis.

183 **2.7 UHPLC/HRMS parameters**

184 The analysis was performed in a Thermo Scientific liquid chromatography system consisting
185 of a binary UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS, connected to a quadrupole orbitrap Qexactive
186 hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), which was equipped
187 with a heated electrospray ionization probe (HESI-II). The column used was a ZORBAX SB-
188 C18 (2.1x 100 mm, 1.8-µm particle size) with a guard column (2.1 x 5 mm, 1.8-µm particle
189 size). Both of them were purchased from Agilent Technologies (USA). The temperature used
190 in this analysis was 40° C, the flow was 0.5 mL/min for HT and 0.4 mL/min for tyrosine and the
191 injection volume was 5 µL. HT was analyzed following the described chromatographic
192 conditions which consisted of two phases (A) aqueous formic acid solution 0.1% and (B)
193 solution 0.1% of formic acid in methanol. The gradient was: 0-1 min (5% B); 1-7 min (100% B);
194 7-8.5 min (100% B); 8.6-10 min (5% B). A target MS² in negative mode was performed. Parallel
195 Reaction Monitoring (PRM) of the [M+H]⁻ at 153.05572 and normalized collision energy (NCE)
196 was set at 25 eV. Xcalibur software and TraceFinder (version 3.3) software were used for
197 instrument control and data acquisition.

198 The analysis of tyrosine presents slight differences regarding the gradient as follows: 0-1 min
199 (5% B); 1-3 min (100% B); 3-4 min (100% B); 4.1-5 min (5% B). A target MS² in negative mode
200 was performed for HT and in positive mode for tyrosine using the same software for data
201 analysis. PRM of the [M+H]⁺ at 182.08117 and NCE was set at 40 eV.

202 **2.8 Statistical Analysis**

203 The data were subjected to ANOVA and Fisher's Least Significant Difference (LSD). The
204 results were reported as the mean \pm standard deviation (SD). Differences at $p < 0.05$ were
205 considered statistically significant. InfoStat version 2019 was used for data analysis.

206 **3. Results**

207 **3.1 HT occurrence in SM by different yeast strains**

208 Figure 1 shows HT is produced by all the yeast strains at the end of the fermentation of SM
209 (day 7). Commercial *S. cerevisiae* yeast strains produce more HT than the non *S. cerevisiae*
210 tested (*T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*) and autochthonous one (*S. cerevisiae* Yero 2.23
211 and *S. cerevisiae* Yero 2.24), being the RF the biggest HT producer (6.12 ng/mL).

212 As RF synthesized the highest concentration, it was selected for further experiments.

213 **3.2 HT occurrence in SM with different tyrosine concentrations**

214 Figure 2 displays the production of HT in the extracellular compartment during AF of SM. Musts
215 contained 10 mg/L or 60 mg/L of tyrosine and the yeast used was RF strain. At the beginning
216 ($t=0$), HT is absent as expected and it was detected from the first day of AF in every sample.
217 Results at 10 mg/L of tyrosine concentration show that HT is present from the very first day
218 and no statistical differences are observed from day 2 to the following days. Conversely, when
219 tyrosine concentration is 60 mg/L, the higher concentration is determined at day 3. Then it
220 decreases slightly. Significant differences according to ANOVA are marked in figure 2.

221 HT derives from tyrosol, which is formed from tyrosine by the Ehrlich pathway (Mas et al.,
222 2014). Therefore, the hypothesis of this work was that the more tyrosine concentration in the
223 media, the higher HT content could be produced. However, despite tyrosine concentration was
224 six times higher, HT was not determined in that proportion (Figure 2).

225 To confirm that yeast synthesizes HT, it was analyzed in the intracellular media.
226 Concentrations are lower in the intracellular media than in the extracellular compartment. The

227 highest concentrations detected were at day 6 and 5 when the must had 10 mg/L and 60 mg/L
228 of tyrosine concentration, respectively (data not shown).

229 **3.3 Tyrosine occurrence in SM with different tyrosine concentrations**

230 Tyrosine was monitored along the fermentation to verify the yeast uses it. As it could be
231 expected, tyrosine decreases in the extracellular media from day zero. In the must with an
232 initial tyrosine concentration of 10 mg/L, the yeast consumes a 99.45% of tyrosine from day
233 zero to the second day of fermentation. Afterwards, the fourth day tyrosine could be determined
234 in noticeably quantities in the extracellular compartment (0.027 mg/L). On the other hand,
235 when the must had 60 mg/L, the yeast consumes a 74.06% of tyrosine from the first day to the
236 second day of fermentation. Afterwards, the eighth day the production increases (0.009 mg/L).
237 Figure 3 shows the occurrence of tyrosine in the intracellular compartment during AF. There
238 are no significant differences regarding the initial tyrosine concentration, with the exception
239 of day 8. For both conditions, the highest intracellular tyrosine concentration was measured at
240 day 3.

241 **3.4 HT occurrence in grape must**

242 Figure 4 shows the production of HT in the extracellular compartment during AF of natural
243 musts (Palomino Fino and Chardonnay varieties). Grape musts were sterilized in order to
244 eliminate the microbial load and to observe the effects of the strain under study (RF).

245 Similarly to the experiments with SM, RF strain produces HT, excreting it in the extracellular
246 media during AF. Indeed, HT is detected at the beginning of the AF in every sample. We
247 observe higher HT concentrations with grape musts than SM. Specifically, grape musts
248 concentrations are 2.6-4.4 times higher. If we compare both grape musts, the highest values
249 are produced with the Chardonnay variety at the middle of the fermentation (days 3-4) as figure
250 4 shows.

251 **3.5 Tyrosine occurrence in grape must**

252 Regarding tyrosine occurrence in the extracellular media, concentrations with Palomino Fino
253 must range between 0.004 mg/L (day 4) and 0.012 mg/L (day 2), while concentrations with
254 Chardonnay range between 0.005 mg/L (day 1) and 0.021 mg/mL (day 2) These values are
255 similar to those obtained in the SM with an initial tyrosine concentration of 10 mg/L. There are
256 no significant differences between the musts and neither between the days, with the exception
257 of days 0 (Palomino Fino 0.117 mg/L and Chardonnay 0.109 mg/L) and 1 in both musts.

258 **4. Discussion**

259 Yeasts produce bioactive compounds such as HT deriving from tyrosine and melatonin
260 deriving from tryptophan (Hornedo-Ortega, Cerezo, Troncoso, Garcia-Parrilla, & Mas, 2016).
261 Melatonin follows a zig-zag pattern along the fermentation appearing and disappearing in SM
262 that could reflect a role as signaling molecule (Fernández-Cruz, Álvarez-Fernández, Valero,
263 Troncoso, & García-Parrilla, 2017); (Fernández-Cruz, Cerezo, Cantos-Villar, Troncoso, &
264 García-Parrilla, 2018). Conversely, HT pattern is more reproducible and consistent through the
265 different fermentations: it appears in all the cases and it remains almost constant from the first
266 days and along the AF. Therefore, our data do not support a signaling role for HT but it is a
267 metabolite produced from tyrosine, a nitrogen source. These results are different than those
268 exposed by Guerrini et al (2018) who didn't detect the compound in any of the wines analyzed
269 (Guerrini et al., 2018). The reasons of these differences could be the yeast strains used since
270 the production of HT is yeast strain-dependent (Álvarez-Fernández et al; 2018).

271 It is important that yeasts have available nitrogen in order to carry out the fermentation (Crepin,
272 Nidelet, Sanchez, Dequin, & Camarasa, 2012). Specifically, 140 mg/L is the minimal
273 concentration of YAN necessary for the fermentation (Vendramini et al, 2017). If the nitrogen
274 available is insufficient, the fermentation becomes slower and there is a high risk of stinking
275 (Bell & Henschke, 2005). Thus, this was the selected YAN for our experiments with SM in order
276 to force the yeast to use tyrosine, a non-preferred source. However, no higher intracellular
277 concentrations were determined as tyrosine increased, showing that the capacity of using
278 tyrosine seems to be limited.

279 Some factors that can affect the YAN and amino acid profile, including tyrosine produced by
280 the must, are grape variety, grape berry ripening, grape processing, geographical origin and
281 climate (Tesnière, Brice, & Blondin, 2015). Henschke et al. (1993) observed that tyrosine
282 values in some white wines were: Chardonnay 6 mg/L; Riesling 3 mg/L; Sauvignon Blanc 24
283 mg/L and Traminer 5 mg/L (Henschke & Jiranek, 1993). Moreover, in another study the
284 average value of tyrosine in 9 white musts was 36.7 mg/L (Cabrita, Ratola, Laureano, & Alves,
285 2007). Ünal et al. (2015) reported for white wines the following values: Emir 56.15±16 mg/L;
286 Narince 28.85±2 mg/L and Sultaniye 35.16±11 mg/L (Ünal, Şener, Şen, & Yilmaztekin, 2015).
287 In our study, tyrosine values selected for SM fermentations are similar to those described and
288 results show that tyrosine initial concentration does not have an impact on HT concentration.
289 Therefore, it is advisable to study the yeast involved in winemaking.

290 Álvarez-Fernández et al. (2018) reported that yeast can synthesize HT as it was detected in
291 the intracellular medium. As it is well known that yeast synthesizes tyrosol through the Ehrlich
292 pathway, a possible way to explain HT synthesis is the hydroxylation of tyrosol which has been
293 recently evidence by Muñoz-Calvo et al. (2020). Our data shows that different strains present
294 varied capacities for the synthesis and their selection could have an impact on the final
295 concentration of this bioactive. In this paper, RF outstands among others strains. Table 1
296 shows a comparison of HT synthesis by different yeast strains. Furthermore, the must has also
297 a role as higher concentrations are achieved in natural grape musts if compared to SM. A
298 possible explanation could be that endogenous enzymes of grapes could catalyze the
299 hydroxylation of tyrosol to HT (Guerrini et al, 2018). Although olive oil and fermented beverages
300 are the main food sources of HT, its production has been investigated in other food matrices.
301 For instance, HT was the most abundant phenolic compound in sunflower-stalks (3.79 mg/L)
302 (Martínez-Cartas, Olivares, & Sánchez, 2019), in olive oil vinegar (1.019 mg/L) (De Leonardis
303 et al., 2018) and in green cracked table olives the concentrations were between 100-800 mg/L
304 (Anagnostopoulos et al., 2020). Moreover, the values obtained in fermented white musts
305 (21.78 µg/L at maximum) are remarkably lower than those reported for red must, specifically
306 Tempranillo with higher concentrations of HT at day 2 (235 µg/L) (Álvarez-Fernández et al.,

307 2018). These results are consistent with already published data that describe higher HT in red
308 wines (3.66-4.20 mg/L) than in white ones (1.72-1.92 mg/L) (Fernández-Mar et al., 2012). In
309 the present work, we sterilized the must to ensure the production of HT was due to the strain
310 inoculated. Remarkably, lower values were obtained after the elimination of the autochthonous
311 flora; HT concentration after the fermentation of sterilized must was 167 µg/L in Chardonnay
312 and 89 µg/L in Palomino Fino. Grape microflora could be responsible for the difference
313 between reported values and those we obtained as we sterilized grape musts. Indeed, tyrosine
314 concentration does not seem to be a relevant factor showing to be produced at a constant rate.
315 Apparently, the presence of different strains could be more important to achieve higher
316 amounts.

317 HT concentrations obtained in this study are lower than those observed in a study conducted
318 by Piñeiro et al. (2011). In that paper, 15 red wine varieties were analyzed and concentrations
319 ranged between 0.28 mg/L and 5.02 mg/L. This fact leads out to think in another alternatives
320 pathways involving polyphenols as red wines are richer in HT than rosé and white ones
321 (Ragusa et al., 2017). In this paper, HT concentration in Chardonnay was 2.3 ± 1.3 mg/kg².

322 As discussed before, tyrosine concentration does not seem to have a role in HT production
323 because, HT concentrations obtained were the same in both conditions (10 mg/L and 60 mg/L).
324 Therefore, there might be other factors that affect HT production. On one hand, different
325 microorganism belonging to the autochthonous flora could also have the capacity to produce
326 HT increasing final concentration. Additionally, different metabolic pathways, apart from the
327 hydroxylation of tyrosol could be possible. For instance, the excision of macromolecules of
328 polyphenolic nature in a similar way as HT derives from oleuropein in the olive. Further
329 research is needed to explore these facts.

330 **5. Conclusion**

331 In conclusion, this study aimed to explore those factors related to the AF process influencing
332 the production of HT. Yeast strain was the first one selected. HT was produced by all the yeast
333 strains under study. Commercial *S. cerevisiae* yeast strains were those which produced higher

334 concentrations, being the RF the most producer. The second one was the initial tyrosine
335 concentration of the must. Our results reveal that distinct from what might be expected tyrosine
336 initial concentration does not seem to have a role in HT production because, although we
337 increased it six times in the SM, in general HT concentrations obtained were the same in both
338 conditions. Thirdly, the must nature through the differences in synthetic and natural grape
339 musts. HT was produced in higher amount in grape musts than in synthetic must, specifically,
340 in Chardonnay.

341 Therefore, our results point out that efforts in other strategies should be made to unravel those
342 factors that might increase the production of HT in order to obtain wines richer in this bioactive
343 compound.

344 **Funding**

345 This work was supported by the National Programme of Research (Spanish Ministry of
346 Economy and Competitiveness AGL2016-77505-C3-2-R) and Marco Programa Operativo
347 Feder Andalucía 2014-2020. Project number US-1263469.

348 **Conflicts of interest**

349 Inmaculada Rebollo-Romero, Edwin Fernández-Cruz, Fernando Carrasco-Galán, Eva Valero,
350 Emma Cantos-Villar, Ana Belén Cerezo Ana M. Troncoso and M. Carmen Garcia-Parrilla
351 declare they have no conflicts of interest.

352 **Acknowledgements**

353 The authors acknowledge the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-
354 77505-C3-2-R) and Universidad de Sevilla (Programa Operativo Feder Andalucía 2014-2020.
355 Project number US-1263469). Professor Fernando Govantes from the CABD (Centro Andaluz
356 de Biología del Desarrollo) and Rocío Valderrama from the CITIUS, Universidad de Sevilla.

357 **References**

- 358 Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-
359 Parrilla, M. C. (2018). Determination of hydroxytyrosol produced by winemaking yeasts
360 during alcoholic fermentation using a validated UHPLC–HRMS method. *Food Chemistry*,
361 242(September 2017), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.072>
- 362 Álvarez-Fernández, M. A., Fernandez-Cruz, E., García Parrilla, M. C., Troncoso, A. M., Mattivi,
363 F., Vrhovsek, U., & Arapitsas, P. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota*
364 *delbrueckii* intra- and extra-cellular aromatic amino acids metabolism. *Journal of*
365 *Agricultural and Food Chemistry*, acs.jafc.9b01844.
366 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01844>
- 367 Anagnostopoulos, D. A., Goulas, V., Xenofontos, E., Vouras, C., Nikoloudakis, N., & Tsaltas,
368 D. (2020). Benefits of the use of lactic acid bacteria starter in green cracked cypriot table
369 olives fermentation. *Foods*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/foods9010017>
- 370 Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation
371 and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
372 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- 373 Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., & Alves, A. (2007). Relationship Between Biogenic
374 Amines and Free Amino Acid Contents of Wines and Musts from Relationship Between
375 Biogenic Amines and Free Amino Acid Contents of Wines and Musts from Alentejo (
376 Portugal), 1234. <https://doi.org/10.1080/03601230600856967>
- 377 Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ... De
378 Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial
379 activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.
380 *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 622–629.
381 <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0>
- 382 Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2012). Sequential Use of

383 Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: a Model
384 Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Applied and*
385 *Environmental Microbiology*, 78(22), 8102–8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>

386 De Leonardis, A., Macciola, V., Iorizzo, M., Lombardi, S.J., Lopez, F., & Marconi, E. (2018).
387 Effective assay for olive vinegar production from olive oil mill wastewaters. *Food*
388 *Chemistry*, 240, 437-440. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.159>

389 Echeverría, F., Ortiz, M., Valenzuela, R., & Videla, L. A. (2017). Hydroxytyrosol and
390 cytoprotection: A projection for clinical interventions. *International Journal of Molecular*
391 *Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050930>

392 Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M. A., Valero, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla,
393 M. C. (2017). Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic
394 fermentation by different wine yeast strains. *Food Chemistry*, 217, 431–437.
395 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.020>

396 Fernández-Cruz, E., Cerezo, A. B., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C.
397 (2018). Time course of L-tryptophan metabolites when fermenting natural grape musts:
398 effect of inoculation treatments and cultivar on the occurrence of melatonin and related
399 indolic compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 92–100.
400 <https://doi.org/10.1111/ajgw.12369>

401 Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E.
402 (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A
403 review. *Food Chemistry*, 130(4), 797–813.
404 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023>

405 Guerrini, S., Mangani, S., Romboli, Y., Luti, S., Pazzagli, L., & Granchi, L. (2018). Impact of
406 *Saccharomyces cerevisiae* strains on health-promoting compounds in wine.
407 *Fermentation*, 4(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020026>

- 408 Henschke, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeast: Metabolism of nitrogen compounds. In: Wine
409 Microbiology and Biotechnology. *Research Gate*, (August), 77–164.
410 <https://doi.org/10.1089/end.2014.0018>
- 411 Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., de Pablos, R. M., Krisa, S., Richard, T., García-Parrilla, M.
412 C., & Troncoso, A. M. (2018). Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean
413 Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Frontiers in Cellular*
414 *Neuroscience*, 12(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00373>
- 415 Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., & Mas, A. (2016).
416 Melatonin and other tryptophan metabolites produced by yeasts: Implications in
417 cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–7.
418 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01565>
- 419 Martínez-Cartas, M. L., Olivares, M. I., & Sánchez, S. (2019). Production of bioalcohols and
420 antioxidant compounds by acid hydrolysis of lignocellulosic wastes and fermentation of
421 hydrolysates with *Hansenula polymorpha*. *Engineering in Life Sciences*, 19(7), 522–536.
422 <https://doi.org/10.1002/elsc.201900011>
- 423 Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-
424 Parrilla, M. C. (2014). Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of
425 Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *BioMed Research International*,
426 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>
- 427 Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011). Direct liquid chromatography
428 method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines.
429 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683–11689.
430 <https://doi.org/10.1021/jf202254t>
- 431 Ragusa, A., Centonze, C., Grasso, M., Latronico, M., Mastrangelo, P., Sparascio, F., ... Maffia,
432 M. (2017). A Comparative Study of Phenols in Apulian Italian Wines. *Foods*, 6(4), 24.

433 <https://doi.org/10.3390/foods6040024>

434 Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C.,
435 Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, Mc. (2018). Hydroxytyrosol:
436 Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*, 105(July
437 2017), 654–667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>

438 Romboli, Y., Mangani, S., Buscioni, G., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2015). Effect of
439 *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and
440 hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and*
441 *Biotechnology*, 31(7), 1137–1145. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1863-9>

442 Tesnière, C., Brice, C., & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to
443 nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and*
444 *Biotechnology*, 99(17), 7025–7034. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6810-z>

445 Ünal, M. Ü., Şener, A., Şen, K., & Yilmaztekin, M. (2015). Seasonal variation in amino acid
446 and phenolic compound profiles of three Turkish white wine grapes. *Turkish Journal of*
447 *Agriculture and Forestry*, 39(6), 984–991. <https://doi.org/10.3906/tar-1412-82>

448 Vendramini, C., Beltran, G., Nadai, C., Giacomini, A., Mas, A., & Corich, V. (2017). The role of
449 nitrogen uptake on the competition ability of three vineyard *Saccharomyces cerevisiae*
450 strains. *International Journal of Food Microbiology*, 258(June), 1–11.
451 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.006>

452 Vilaplana-Pérez, C., Auñón, D., García-Flores, L. A., & Gil-Izquierdo, A. (2014). Hydroxytyrosol
453 and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition*,
454 1(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00018>

455 Vilela, A. (2019). The importance of yeasts on fermentation quality and human health-
456 promoting compounds. *Fermentation*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020046>

457 Yuri, R., Silvia, M., Giacomo, B., & Massimo, V. (2012). Variability of Tyrosol , Hydroxytyrosol
458 and Tryptophol contents in Sangiovese wines produced by a single strain of
459 *Saccharomyces cerevisiae* Conclusions The contents of tyrosol and hydroxytyrosol in
460 wines fermented by a single strain of, (2006), 11689.

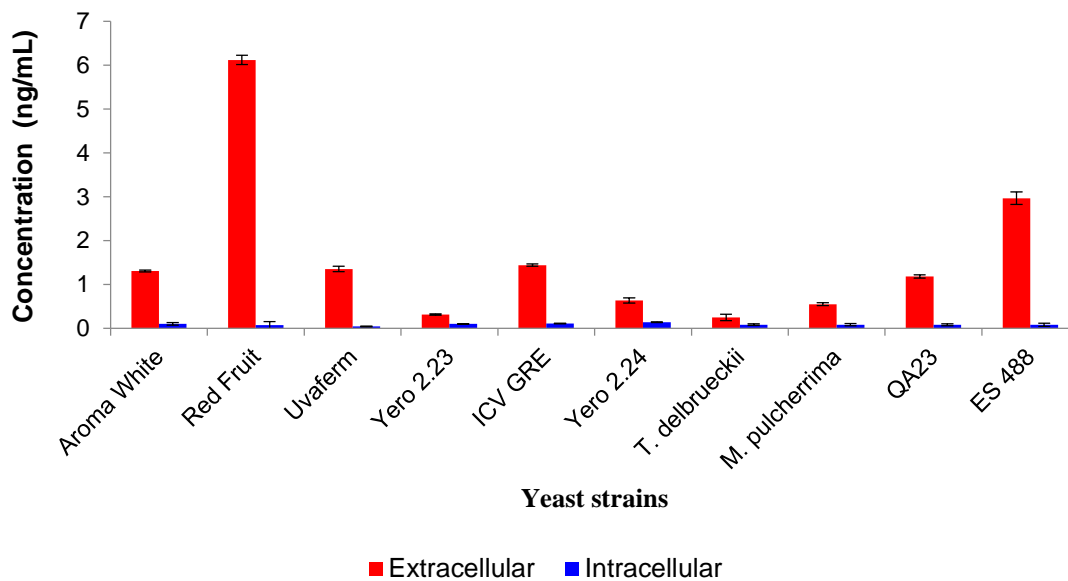


Figure 1. Hydroxytyrosol occurrence. Hydroxytyrosol occurrence in synthetic must by ten wine yeast strains, expressed in ng/mL

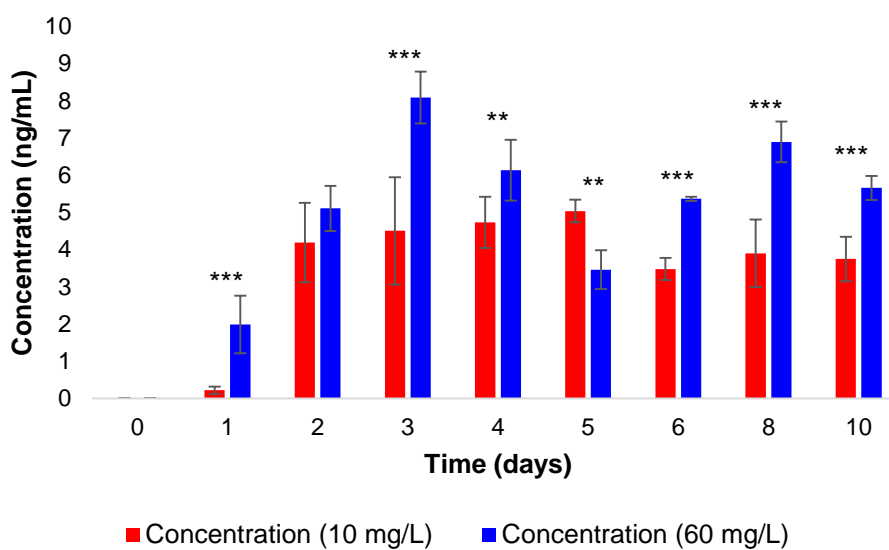


Figure 2. Hydroxytyrosol occurrence in extracellular media in synthetic musts. Evolution of hydroxytyrosol concentration during alcoholic fermentation in synthetic musts with different tyrosine contents, by Red Fruit yeast strain, expressed in ng/mL. Significant differences with $p < 0.05$ are displayed with *, $p < 0.01$ with ** and $p < 0.001$ with ***

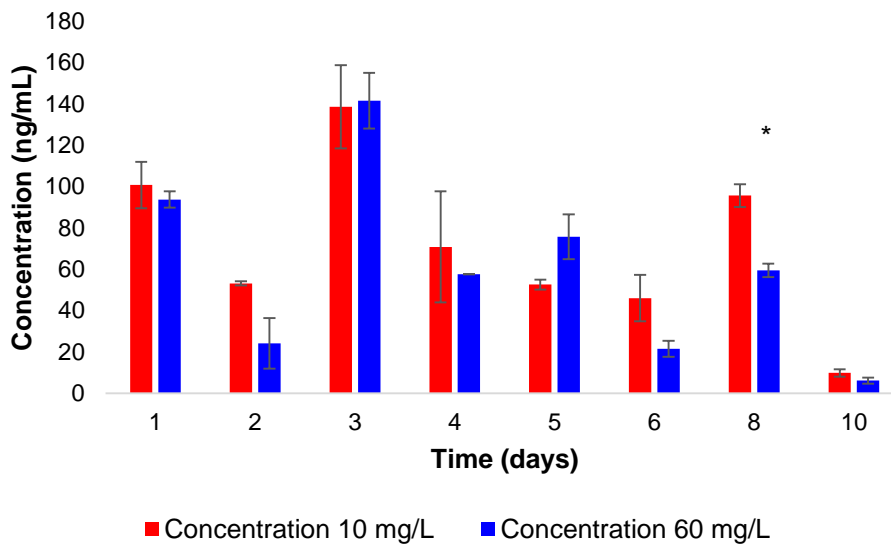


Figure 3. Tyrosine occurrence in intracellular media in synthetic musts. Evolution of tyrosine concentration during alcoholic fermentation in synthetic musts with different tyrosine contents, by Red Fruit yeast strain, expressed in ng/mL. Significant differences with $p < 0.05$ are displayed with *, $p < 0.01$ with ** and $p < 0.001$ with ***

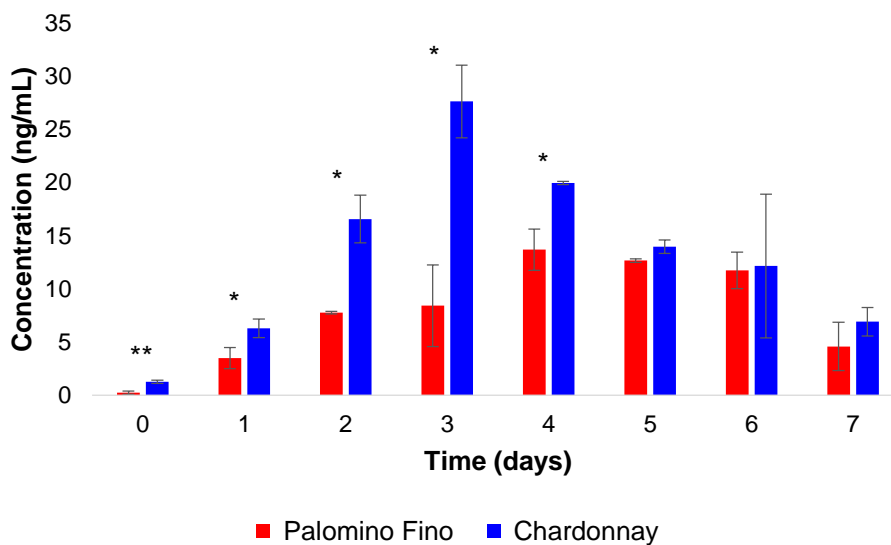


Figure 4. Hydroxytyrosol occurrence in extracellular media in grape musts. Evolution of hydroxytyrosol concentration during alcoholic fermentation in natural grape musts (Palomino Fino and Chardonnay), by Red Fruit yeast strain, expressed in ng/mL. Significant differences with $p < 0.05$ are displayed with *, $p < 0.01$ with ** and $p < 0.001$ with ***

Table 1. Hydroxytyrosol concentration in synthetic must and white and red must

Yeast strain	HT in SM (ng/mL)	HT in white must (ng/mL)	HT in red must (ng/mL)	Reference
<i>T. delbrueckii</i>	0.25			
Yero 2.23	0.32			
<i>M. pulcherrima</i>	0.55			
Yero 2.24	0.64			
QA23	1.19			
Aroma White	1.31			
Uvaferm	1.36			
ICV GRE	1.44			
ES 488	2.97			
Red Fruit	6.12 (screening), 3.31 (10 mg/L of tyrosine) and 4.74 (60 mg/L of tyrosine)	7.82 (Palomino Fino) and 13.09 (Chardonnay)		
Aroma White		89, 159, 173, 185, 238 and 288 (max)		Álvarez-Fernández et al., 2018
Red Fruit			235 (max)	Álvarez-Fernández et al., 2018
QA23			400 (max)	Álvarez-Fernández et al., 2018
U.C.L.M. S325			175	Bordiga et al., 2016

1 **The effects of fermentation temperature and sterilization on the production of the**
2 **antioxidant hydroxytyrosol**

3 Inmaculada Rebollo-Romero^a, Marta Gallardo^a, Marina González^a, Eva Valero^b, Emma
4 Cantos-Villar^c, Ana B. Cerezo^a, Ana M. Troncoso^a, M. Carmen Garcia-Parrilla^{a,*}

5 ^aDepartamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de
6 Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012, Sevilla, España

7 ^bDepartamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de
8 Olavide, Ctra. Utrera, Km 1, 41013, Sevilla, España

9 ^cInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la
10 Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía,
11 Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, España

12 Corresponding Author:

13 Professor M. Carmen Garcia-Parrilla

14 Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de
15 Farmacia, Universidad de Sevilla

16 E-mail address: mcparrilla@us.es

17 Phone +34954556759

18 Fax 954233765

19

20 Abbreviations: AF alcoholic fermentation; EVOO extra virgin olive oil; HT hydroxytyrosol; RF
21 Red Fruit; SM synthetic must; YPD yeast extract peptone dextrose

22 **Abstract**

23 Hydroxytyrosol is well known for its potent antioxidant activity. Moreover, it also possesses
24 anticarcinogenic, antimicrobial, cardioprotective and anti-inflammatory properties. Apart from
25 olive oil, wine is another of its main food sources.

26 We hypothesize the fermentation temperature as well as the sterilization of natural grape
27 musts have an effect on the production of hydroxytyrosol.

28 Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Red Fruit was the biggest hydroxytyrosol producer in
29 synthetic must. For this reason, it was the yeast strain selected to carry out the study.

30 This work aims to explore the effects of different fermentation temperatures (18°C and 25°C)
31 and different microorganisms in comparison to only one strain on the synthesis of
32 hydroxytyrosol and tyrosol.

33 The fermentation temperature influenced the production of HT and tyrosol in natural grape
34 musts (Palomino Fino, Tempranillo and Pedro Ximénez). In general, the highest
35 concentrations were discovered in samples fermented at 25°C, with variability existing
36 between the musts.

37 On the other hand, the sterilization of the must influenced the production of HT and tyrosol. In
38 general, the highest concentrations appeared in non-sterilized musts, although there was
39 variability between the musts.

40

41 **Keywords:** bioactive, temperature, sterilization, tyrosol, wine

42 **1. Introduction**

43 Hydroxytyrosol (HT) 3,4-Dihydroxyphenyl-ethanol is known for its potent antioxidant
44 activity (Tripoli et al., 2005); (Cornwell & Ma, 2008). Moreover, it has health promoting
45 properties like antimicrobial (Bisignano et al., 2010), cardioprotective (Panel & Nda,
46 2011), anti-inflammatory (Gong, et al., 2008) and anticancer (Cornwell & Ma, 2008);
47 (Roleira et al., 2015).

48 HT is synthesised from its intermediate, tyrosol which is produced from tyrosine by
49 yeasts during alcoholic fermentation (AF). This occurs through a route called Ehrlich
50 pathway (Álvarez-Fernández et al., 2018); (Hazelwood et al., 2008) which includes the
51 transamination of tyrosine, the decarboxylation of p-hydroxyphenylpyruvate and the
52 reduction of p-hydroxyphenylaldehyde (Mas et al., 2014b).

53 Its main source is the extra virgin olive oil (EVOO) (Martínez-Zamora et al., 2021) but it
54 is also present in wines (Piñeiro et al., 2011b). Specifically, HT is present in EVOO in a
55 concentration between 50 to 800 mg/kg (Visioli et al., 2000). On the other hand, white
56 wines contain around 1.8 mg/L of HT and HT concentrations in red wines are around 3.9
57 mg/L (Di Tommaso et al., 1998). In a study performed by Piñeiro et al. (2011) HT
58 concentrations range between 0.28 mg/L and 5.02 mg/L and tyrosol concentrations
59 range between 20.38 mg/L and 44.46 mg/L.

60 It has been established a relationship between AF temperature and phenolic composition
61 of wine. Specifically, higher fermentation temperatures increased phenolic extraction
62 (Sacchi et al., 2005). In another study, it was also discovered that the temperature can
63 influence the phenolic content of wines ("Greek red and white wines by means of
64 classical Cranfield Health," 2015). Bordiga et al. (2016) observed fermentation
65 temperature has an effect on the production of HT. Specifically, the production of HT at
66 the end of the AF varied as a function of the temperature (16°C and 22°C). The samples
67 exposed to an AF temperature of 22°C (≈0.8-1.55 mg/L) showed higher content of HT
68 than those exposed to an AF temperature of 16°C (≈0.75-1.35 mg/L). On the other hand,

69 HT concentrations at the half of the AF didn't vary as a function of the temperature
70 (Bordiga et al., 2016).

71 Some AF temperatures selected to carry out the AF with white and red wines, were de
72 following: 17°C (Cabrita et al., 2007), 18°C (Álvarez-Fernández et al., 2018); (Fernández-
73 Cruz et al., 2018), 20°C (Benito et al., 2015), 23 ± 1°C (Raposo et al., 2016), 24°C
74 (Minnaar et al., 2019) and 25°C (Lee et al., 2009).

75 Álvarez-Fernández et al. (2018) fermented not sterilized white grape musts at 18°C. The
76 highest HT concentrations reached, in the six white musts studied, were the following:
77 Palomino Fino 89 ng/mL; Moscatel 159 ng/mL; Corredera 173 ng/mL; Chardonnay 185
78 ng/mL; Vijiriega 238 ng/mL and Sauvignon Blanc 288 ng/mL. Nevertheless, in our
79 previous work, the highest concentrations obtained in two sterilized (100 °C for 10 min)
80 white musts were much lower: Palomino Fino (13.68 ng/mL) and Chardonnay (27.63
81 ng/mL). These two natural grape musts were fermented at 25°C (Rebollo-Romero et al.,
82 2020). Chardonnay highest concentrations in both studies were observed at the half of
83 AF. We sterilized the musts to ensure the production of HT was due to the strain
84 inoculated. Grape microflora could be responsible for the difference between reported
85 values and those we obtained as we sterilized grape musts.

86 The purpose of this work is to explore the effects of different fermentation temperatures
87 (18°C and 25°C) and the effects of different microorganisms in comparison to only one
88 strain on the production of HT and tyrosol in natural grape musts.

89 **2. Materials and methods**

90 **2.1 Yeast strains**

91 Commercial wine yeast strain *S. cerevisiae* Enartis Ferm Red Fruit (RF) (Enartis) was
92 selected to carry out the AF since it was discovered to be the biggest HT producer in
93 synthetic must (SM).

94 **2.2 Natural grape must**

95 White (Pedro Ximénez and Palomino Fino) and red grape musts (Tempranillo) belonged
96 to the Rancho de la Merced (IFAPA) in Jerez de la Frontera, Spain (longitude 06:00:58
97 W, latitude 36:45:29 N), were used in the experimental process.

98 For each type of natural must 4 batches of samples were organized as follows:

99 1) Sterilization (100°C for 10 min) and fermentation temperature of 18°C

100 2) Sterilization (100°C for 10 min) and fermentation temperature of 25°C

101 3) No sterilization and fermentation temperature of 18°C

102 4) No sterilization and fermentation temperature of 25°C

103 **2.3 Preinoculation and Inoculation**

104 Before inoculating the must, the yeast strain RF was rehydrated in a bath at 37°C for 30
105 min. Then, it was plated on yeast extract peptone dextrose (YPD) agar (1% yeast extract,
106 2% glucose, 2% peptone and 2% agar) and it was incubated at 28°C for 48-72 h.
107 Subsequently, it was transferred into flasks with liquid YPD to let the yeasts grow
108 overnight. The pre-inoculum was left for 12-24 hours under stirring at 150 rpm, at 28° C,
109 before inoculation in natural musts.

110 Some grape musts were sterilized at 100°C for 10 min. Each flask with 80 mL of natural
111 grape must was inoculated with 10⁶ cells/mL and capped with plugs and syringes in order
112 to release the carbon dioxide. AF were carried out in triplicate. The fermentation was
113 monitored by weighing the flasks the day zero and at the middle of the AF (days 5 and
114 6) and at the end (days 8 and 9) before and after sampling. The optical density was also
115 measured.

116 **2.4 Sampling**

117 Samples were collected in tubes, in a volume corresponding to 10⁹ cells, at days 0
118 (beginning of AF), 5 and 6 (middle of AF) and 8 and 9 (end of AF). Samples fermented
119 at 18°C were collected one day later (days 6 and 9) in comparison to those fermented at
120 25°C (days 5 and 8) because AF was slower. Then, samples were centrifuged at 4500

121 rpm, at room temperature for 3 min. Extracellular samples were stored at -80 °C until
122 samples clean up.

123 **2.5 Sample clean up**

124 Extracellular samples were cleaned up using C18 SPE cartridges (Variant, Aligent). They
125 were conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of milliQ water. Then, 1-2 ml of sample
126 was loaded and these cartridges were washed with 2 mL of a 10% v/v methanol/water
127 solution. Analytes were eluted with 1 mL of methanol. Samples were dried until dryness,
128 at 2000 rpm, at 30°C for 23 h, with a vacuum concentrator (HyperVAC-LITE, Gyrozen,
129 Korea) (Álvarez-Fernández et al., 2019).

130 Extracellular samples were reconstituted with acetonitrile/water (10/90 v/v). Samples
131 were centrifuged at 10000 rpm, at room temperature, for 10 min and they were stored at
132 -80 °C until the analysis.

133 **2.6 UHPLC/HRMS analysis**

134 Determination of tyrosol and HT was performed with a Thermo Scientific Liquid
135 Chromatography system consisting of a binar UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS,
136 connected to a quadrupole-orbitrap Qexactive hybrid mass spectrometer (ThermoFisher
137 Scientific, USA), which was equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI-
138 II). Xcalibur software was used for instrument control and data acquisition. Separation
139 was carried out using a Zorbax SB-C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm particle size) column
140 (Agilent Technologies, USA) at a flow rate of 0.4 ml/min. A binary gradient consisting of
141 (A) water containing 0.2% acetic acid and (B) acetonitrile was used with the following
142 elution profile: 0-1 min (5% B), 1-7 min from 5% to 100% B, 7–8.5 min (100% B) and 8.5-
143 10 min (5% B). The injected volume was 5 µL.

144 A Parallel Reaction Monitoring method was used in negative mode at resolution 35000
145 at m/z 200 FWHM and isolation window of 1 m/z and normalized collision energy was
146 set at 40 eV. The monitored species and masses [M+H]⁻ were: tyrosol (182.08117) and
147 hydroxytyrosol (153.05572). HESI source parameters were: spray voltage, 3.0 kV; S lens

148 level, 50; capillary temperature, 320 °C; sheath, auxiliary and sweep gas flow, 50, 15
149 and 2 respectively (arbitrary units); and probe heater temperature, 425 °C. For data
150 treatment, TraceFinder 5.1. software was used.

151 **2.7 Statistical Analysis**

152 StatSoft, Inc. Statistica Software (version 7) was used for the statistical analysis. The
153 data was subjected to ANOVA. The results were reported as the mean \pm standard
154 deviation (SD). Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

155 **3. Results**

156 **3.1 The effect of the temperature on the production of HT and tyrosol**

157 In relation to Tempranillo grape must, significant differences appeared between the non-
158 sterilized samples at the end of fermentation, being higher in those fermented at 25°C
159 (Table 2).

160 In the case of Palomino Fino, as in Tempranillo, the differences were also significant
161 between the non-sterilized samples at the end of fermentation, being also higher in those
162 fermented at 25°C (Table 1).

163 In contrast to the two previous musts, in Pedro Ximénez natural must, significant
164 differences appeared, on one hand, between the samples sterilized at the end of
165 fermentation and, on the other hand, between those not sterilized at the end of
166 fermentation. In both cases, the highest concentrations occurred in those fermented at
167 18°C (Table 3).

168 Regarding tyrosol, in Tempranillo, differences were significant in the non-sterilized
169 samples at the end of AF, being the concentrations higher in those fermented at 25°C
170 (Table 2).

171 In Palomino Fino, there were no significant differences in tyrosol concentrations between
172 any of the samples (Table 1).

173 In the case of tyrosol in Pedro Ximénez, the significant differences occurred, on one
174 hand, between the samples sterilized at the end of fermentation and, on the other hand,
175 between those not sterilized at the end of fermentation. In both cases, the concentrations
176 were higher in those fermented at 18°C (Table 3).

177 **3.2 The effect of the sterilization on the production of HT and tyrosol**

178 In the case of Tempranillo, HT concentrations only showed significant differences in the
179 samples at the end of fermentation at 25°C, being higher in the non-sterilized samples
180 (Table 2).

181 In relation to the fermentation carried out with Palomino Fino grape must, as in
182 Tempranillo, all the non-sterilized samples presented significantly higher concentrations
183 of HT compared to the sterilized ones. Specifically, the highest values were reached at
184 the end of fermentation (day 9) in samples fermented at 25°C (25.75 ± 2.18 ng/mL)
185 (Table 1).

186 In Pedro Ximénez natural must, samples only showed significant differences at the end
187 of fermentation at a temperature of 18°C and in the middle of fermentation when samples
188 were fermented at 25°C, being HT concentration higher in all cases in the non-sterilized
189 samples (Table 3)

190 Regarding Tempranillo, tyrosol concentrations were significantly higher in the final non-
191 sterilized sample at 25°C and in the mid-fermentation sample sterilized at 25°C, while at
192 18°C the highest tyrosol concentrations were found in the final sterilized samples (Table
193 2).

194 In the case of Palomino Fino, the tyrosol concentration also showed significant
195 differences between the non-sterilized and sterilized samples, except in the middle of
196 fermentation at 25°C, giving rise to higher concentrations in the non-sterilized samples
197 in all samples (Table 1).

198 In the case of tyrosol in Pedro Ximénez, tyrosol concentrations only showed significant
199 differences in the samples at the end of fermentation at 25°C, being higher in the
200 sterilized samples (Table 3).

201 **4. Discussion**

202 Regarding the temperature factor, Palomino Fino and Tempranillo musts seemed to
203 follow the same trend in HT production, since the highest concentrations were obtained
204 in the samples fermented at 25°C at the end of fermentation. However, in Pedro Ximénez
205 the highest concentrations were observed at the end of fermentation in those fermented
206 at 18°C.

207 On the other hand, in the case of tyrosol, the highest concentrations in Tempranillo
208 appeared in samples fermented at 25°C at the end of AF and in Pedro Ximénez at the
209 end of fermentation in those fermented at 18°C.

210 The temperature of 25°C gave rise to higher concentrations of HT in Tempranillo and
211 Palomino Fino musts, which is in agreement with Bordiga et al., (2016). These authors
212 observed that the Monastrell grape must that resulted in a higher concentration of HT
213 was fermented at a higher temperature (22°C) while the one that resulted in a lower
214 concentration was fermented at a lower temperature (16°C). The temperature factor
215 significantly affected all the sampling steps, with the exception of the middle of the
216 fermentation (Bordiga et al., 2016).

217 However, according to Romboli et al., (2015) the slower fermentations in Sangiovese
218 grape must gave rise to higher concentrations of HT + tyrosol. In this study, fermentations
219 carried out at 18°C were slower than those carried out at 25°C.

220 Álvarez-Fernández et al., (2018), obtained considerably higher concentrations of HT in
221 non-sterilized natural grape must fermented at 28°C.

222 In the study by Álvarez-fernández et al., (2018) in Tempranillo, not sterilized, with RF
223 yeast, any HT was synthesized on day 0, the concentrations were approximately 150-
224 200 ng/mL on days 5-6 and no HT was produced on days 8-9. The maximum

225 concentration was obtained on day 3 and it was 235 ng/mL. These results are superior
226 to those presented in this Thesis in non-sterilized Tempranillo with RF yeast. Specifically,
227 these concentrations were 1.07 ± 0.04 ng/mL on day 5, 0.96 ± 0.17 ng/mL on day 6,
228 19.87 ± 3.48 ng/mL on day 8 and 1.83 ± 1.01 ng/mL on day 9. One difference is that in
229 the study by Álvarez-Fernández et al., (2018) the fermentation temperature was 28°C
230 while in this Thesis the fermentation temperatures were 18°C and 25°C.

231 Regarding the sterilization of the musts, the three natural grape musts Tempranillo,
232 Palomino Fino and Pedro Ximénez seemed to follow the same trend in the production of
233 HT since the highest concentrations were obtained in the non-sterilized samples. This
234 makes sense because the microbial load present in the musts can also be, in part,
235 responsible for the production of HT and not only the yeast strain inoculated, in this case,
236 the RF.

237 On the other hand, in Palomino and Pedro Ximénez musts, the highest concentrations
238 of tyrosol were obtained in the non-sterilized samples, while in the Tempranillo they were
239 obtained in the sterilized ones fermented at 18°C, in the sterilized ones fermented at
240 25°C at the middle of AF and in the non-sterilized fermented at 25°C at the end of AF.

241 **5. Conclusion**

242 In conclusion, this study aimed to explore two factors related to the AF process
243 influencing the production of HT and tyrosol: the AF temperature and the sterilization of
244 different natural grape musts. Fermentation temperature influences HT and tyrosol
245 production. However, it also depends on the grape variety since higher concentrations
246 of HT are obtained in Tempranillo and Palomino musts fermented at 25°C and higher
247 concentrations of tyrosol are obtained in Tempranillo must fermented at 25°C. However,
248 in the Pedro Ximénez must, the highest concentrations of TH and tyrosol appear in the
249 fermented at 18°C.

250 On the other hand, the sterilization of the must influenced the production of TH since
251 higher concentrations appear in the non-sterilized musts compared to the sterilized ones,

252 which supports the hypothesis that the yeast consortia would produce more amount of
253 HT than the individual yeasts. In the case of tyrosol, it depends on the grape variety,
254 since in the Palomino and Pedro Ximénez musts, the highest concentrations appear in
255 the non-sterilized samples, while in the Tempranillo it appears in the sterilized ones.
256 Accordingly, our results suggest the necessity to discover other strategies, understood
257 as factors, that might increase the production of HT in order to obtain wines richer in this
258 bioactive compound.

259 **Funding**

260 This work was supported by the National Programme of Research (Spanish Ministry of
261 Economy and Competitiveness AGL2016-77505-C3-2-R; PID2019-108722RB-C32) and
262 Marco Programa Operativo Feder Andalucía 2014-2020 (Project number US-1263469).

263 **Conflicts of interest**

264 Inmaculada Rebollo-Romero, Marta Gallardo, Marina González, Eva Valero, Emma
265 Cantos-Villar, Ana Belén Cerezo Ana M. Troncoso and M. Carmen Garcia-Parrilla
266 declare they have no conflicts of interest.

267 **Acknowledgements**

268 We acknowledge Rocío Valderrama and M^a Eugenia Soria Soria from the CITIUS,
269 Universidad de Sevilla.

270 **References**

271 Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., &
272 García-Parrilla, M. C. (2018). Determination of hydroxytyrosol produced by
273 winemaking yeasts during alcoholic fermentation using a validated UHPLC–HRMS
274 method. *Food Chemistry*, *242*, 345–351.
275 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.072>

- 276 Álvarez-Fernández, M. A., Fernandez-Cruz, E., García Parrilla, M. C., Troncoso, A. M.,
277 Mattivi, F., Vrhovsek, U., & Arapitsas, P. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* and
278 *Torulaspora delbrueckii* intra- and extra-cellular aromatic amino acids metabolism.
279 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *acs.jafc.9b01844*.
280 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01844>
- 281 Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2015). Combine use of selected
282 *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an
283 alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production.
284 *Molecules*, *20*(6), 9510–9523. <https://doi.org/10.3390/molecules20069510>
- 285 Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. Lo, Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (2010). On
286 the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of*
287 *Pharmacy and Pharmacology*, *51*(8), 971–974.
288 <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- 289 Bordiga, M., Lorenzo, C., Pardo, F., Salinas, M. R., Travaglia, F., Arlorio, M., ... Garde-
290 Cerdán, T. (2016). Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol,
291 tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids
292 concentration. *Food Chemistry*, *197*, 1038–1045.
293 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.112>
- 294 Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., & Alves, A. (2007). Relationship Between
295 Biogenic Amines and Free Amino Acid Contents of Wines and Musts from
296 Relationship Between Biogenic Amines and Free Amino Acid Contents of Wines
297 and Musts from Alentejo (Portugal), 1234.
298 <https://doi.org/10.1080/03601230600856967>
- 299 Cornwell, D. G., & Ma, J. (2008). Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of
300 hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food*
301 *Chemistry*, *56*(19), 8774–8786. <https://doi.org/10.1021/jf8015877>

- 302 Di Tommaso, D., Calabrese, R., & Rotilio, D. (1998). Identification and quantitation of
303 hydroxytyrosol in Italian wines. *HRC Journal of High Resolution Chromatography*,
304 21(10), 549–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-
305 4168\(19981001\)21:10<549::AID-JHRC549>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19981001)21:10<549::AID-JHRC549>3.0.CO;2-Z)
- 306 Fernández-Cruz, E., Cerezo, A. B., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla,
307 M. C. (2018). Time course of l-tryptophan metabolites when fermenting natural
308 grape musts: effect of inoculation treatments and cultivar on the occurrence of
309 melatonin and related indolic compounds. *Australian Journal of Grape and Wine
310 Research*, 92–100. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12369>
- 311 Gong D, Geng C, Jiang L, Cao J, Yoshimura H, Zhong L. Effects of hydroxytyrosol-20
312 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother
313 Res*. 2009 May;23(5):646-50. <https://doi:10.1002/ptr.2686>
- 314 Greek red and white wines by means of classical Cranfield Health. (2015).
- 315 Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R.
316 (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on
317 *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*,
318 74(8), 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- 319 Lee, J. E., Hwang, G. S., Lee, C. H., & Hong, Y. S. (2009). Metabolomics reveals
320 alterations in both primary and secondary metabolites by wine bacteria. *Journal of
321 Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10772–10783.
322 <https://doi.org/10.1021/jf9028442>
- 323 Martínez-Zamora, L., Peñalver, R., Ros, G., & Nieto, G. (2021). Olive tree derivatives
324 and hydroxytyrosol: Their potential effects on human health and its use as functional
325 ingredient in meat. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112611>
- 326 Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., &

327 Garcia-Parrilla, M. C. (2014a). Bioactive compounds derived from the yeast
328 metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed*
329 *Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>

330 Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., &
331 Garcia-Parrilla, M. C. (2014b). Bioactive Compounds Derived from the Yeast
332 Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *BioMed*
333 *Research International*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>

334 Minnaar, P. P., du Plessis, H. W., Jolly, N. P., van der Rijst, M., & du Toit, M. (2019).
335 Non-Saccharomyces yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations
336 with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the
337 phenolic content of Syrah wine. *Food Chemistry*, 4, 100070.
338 <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100070>

339 Panel, E., & Nda, A. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims
340 related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative
341 damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL
342 cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA Journal*, 9(4), 1–25.
343 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>

344 Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011a). Direct liquid
345 chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and
346 tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683–
347 11689. <https://doi.org/10.1021/jf202254t>

348 Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011b). Direct liquid
349 chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and
350 tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683–
351 11689. <https://doi.org/10.1021/jf202254t>

352 Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M.,

- 353 Gonzalo-Diago, A., ... Cantos-Villar, E. (2016). Effect of hydroxytyrosol on quality
354 of sulfur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 192, 25–33.
355 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.085>
- 356 Rebollo-Romero, I., Fernández-Cruz, E., Carrasco-Galán, F., Valero, E., Cantos-Villar,
357 E., Cerezo, A. B., ... Garcia-Parrilla, M. C. (2020). Factors influencing the
358 production of the antioxidant hydroxytyrosol during alcoholic fermentation: Yeast
359 strain, initial tyrosine concentration and initial must. *Lwt*, 130, 109631.
360 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109631>
- 361 Roleira, F. M. F., Tavares-Da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido,
362 J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer
363 properties. *Food Chemistry*, 183, 235–258.
364 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>
- 365 Romboli, Y., Mangani, S., Buscioni, G., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2015). Effect of
366 *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zeylanoides* on quercetin, vitisin A and
367 hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and*
368 *Biotechnology*, 31(7), 1137–1145. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1863-9>
- 369 Sacchi, K.L., Bisson, L.F., & Adams, D.O. (2005). A Review of the Effect of Winemaking
370 Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *American Journal of Enology and*
371 *Viticulture*, 56, 197-206.
- 372 Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M.
373 (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and
374 beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98–112.
375 <https://doi.org/10.1079/nrr200495>
- 376 Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil
377 polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 60–

Table 1. Hydroxytyrosol and tyrosol occurrence in Palomino Fino

	TEMPERATURE 18°C		TEMPERATURE 25°C	
	HT	Tyrosol	HT	Tyrosol
Beginning	0	0	0	0
Middle E	0,92 ± 0,04 ^a	4102,74 ± 458,32 ^e	1,56 ± 0,51 ^b	5172,29 ± 784,33
Middle NE	20,78 ± 5,22 ^a	4700,70 ± 342,96 ^e	11,64 ± 2,20 ^b	6514,71 ± 1283,99
Final E	0,75 ± 0,30 ^c	5847,96 ± 1052,46 ^f	1,17 ± 0,33 ^d	5375,87 ± 675,10 ^g
Final NE	15,10 ± 0,67 ^{ch}	8120,49 ± 1480,75 ^f	25,75 ± 2,18 ^{dh}	7218,97 ± 715,02 ^g

Main values and standard deviation are represented (ng/mL). E: sterilized; NE: non sterilized;
Same superscript means significant differences p<0.05

Table 2. Hydroxytyrosol and tyrosol occurrence in Tempranillo

	TEMPERATURE 18°C		TEMPERATURE 25°C	
	HT	Tyrosol	HT	Tyrosol
Beginning	2,57 ± 0,08	0	2,57 ± 0,08	0
Middle E	0,86 ± 0,07	74,91 ± 3,32	0,87 ± 0,17	155,89 ± 33,77 ^b
Middle NE	0,96 ± 0,17	n.d.	1,07 ± 0,04	70,48 ± 19,68 ^b
Final E	1,93 ± 0,56	179,01 ± 47,96 ^c	1,54 ± 0,74 ^a	314,75 ± 174,07 ^d
Final NE	1,83 ± 1,01	79,57 ± 25,94 ^c	19,87 ± 3,48 ^a	7852,90 ± 789,25 ^d

Main values and standard deviation are represented (ng/mL). E: sterilized; NE: non sterilized;
Same superscript means significant differences p<0.05

Table 3. Hydroxytyrosol and tyrosol occurrence in Pedro Ximénez

	TEMPERATURE 18°C		TEMPERATURE 25°C	
	HT	Tyrosol	HT	Tyrosol
Beginning	3,48 ± 0,17	0	3,48 ± 0,17	0
Middle E	0,65 ± 0,26	n.d.	0,59 ± 0,09 ^a	131,37 ± 38,70
Middle NE	0,77 ± 0,32	79,79 ± 2,29	2,84 ± 0,31 ^a	84,56 ± 25,37
Final E	19,35 ± 0,18 ^{bd}	5270,35 ± 2338,46 ^f	1,06 ± 0,12 ^d	305,72 ± 20,12 ^{cf}
Final NE	27,28 ± 0,45 ^{be}	2805,21 ± 477,40 ^g	2,38 ± 1,06 ^e	107,31 ± 0,40 ^{cg}

Main values and standard deviation are represented (ng/mL). E: sterilized; NE: non sterilized;
Same superscript means significant differences p<0.05